

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 28 FEV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 300301

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>8 MARS 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0202968</b> DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>- 8 MARS 2002</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  CABINET LAVOIX 2, Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>(facultatif)</i> <b>BFF 01/0576</b>		

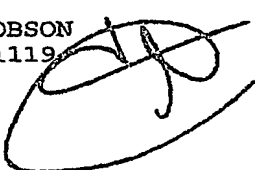

<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date

**3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)**

Nouveau procédé de production de semences hybrides de maïs

<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>	Pays ou organisation		N°
	Date		
	Pays ou organisation		N°
	Date		
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		BIOGEMMA	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	1 rue Edouard-Colonne	
	Code postal et ville	75001 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			

REMISE DES PIÈCES DATE LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI <b>8 MARS 2002</b> <b>75 INPI PARIS</b> <b>0202968</b>	08 540 W / 3
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		BFF 01/0576	
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom Prénom Cabinet ou Société  N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  Adresse		CABINET LAVOIX  2 Place d'Estienne d'Orves  Code postal et ville 75441 PARIS CEDEX 09 N° de téléphone <i>(facultatif)</i> 01 53 20 14 20 N° de télécopie <i>(facultatif)</i> 01 48 74 54 56 Adresse électronique <i>(facultatif)</i> brevets@cabinet-lavoix.com	
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformati	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition, <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		C. JACOBSON n° 92.1119 	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La présente invention concerne un procédé de production et de multiplication de plants de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle, utiles pour la production de semences hybrides de maïs.

5 La production d'hybrides via « l'hybridation sexuelle » des parents ayant des fonds génétiques différents est de grande importance dans la pratique de l'agriculture moderne. En effet, le croisement entre plantes de même espèce mais non apparentées produit une descendance qui manifeste des caractères, tels que le rendement ou la résistance aux maladies, supérieurs à ceux des parents : il s'agit de  
10 l'effet d'hétérosis ou de vigueur hybride. Ainsi la production d'hybrides est-elle souvent utilisée afin d'améliorer à la fois la qualité et le rendement des plantes cultivées.

De plus, ces descendants sont génétiquement uniformes, notamment pour les caractères que sont la productivité, la sensibilité à la verse et à la sécheresse, la  
15 vigueur au départ et la sensibilité aux maladies et aux ravageurs, et donc intéressants pour les agriculteurs.

Sans intervention humaine, la production d'hybrides est limitée par les phénomènes d'autofécondation. La production de semences hybrides nécessite  
20 donc de privilégier la fécondation croisée en empêchant l'autopollinisation par des techniques mécaniques, chimiques ou génétiques. Les différentes voies permettant d'empêcher l'autofécondation en contrôlant la pollinisation incluent notamment:

- la "castration" manuelle, mécanique ou l'inactivation chimique des organes mâles de la plante,
- 25 - l'utilisation d'une plante modifiée présentant une stérilité mâle nucléaire récessive,
- l'utilisation d'une plante modifiée présentant une stérilité mâle cytoplasmique récessive,
- l'utilisation d'une plante mâle stérile nucléaire dominante (stérilité mâle artificielle  
30 ou AMS).

Cependant, certaines de ces techniques ne sont pas totalement efficaces et parfois même difficiles à mettre en œuvre.

La "castration" coûte cher et peut provoquer des pertes de rendement en cas d'erreur.

L'efficacité de l'emploi d'agents chimiques, moins onéreux, dépend des conditions environnementales au moment de l'application du gamétocide, ce qui amène le producteur de semences à prendre des risques considérables à chaque saison.

5 L'utilisation d'une plante mâle stérile nucléaire récessive n'est pas facile à mettre en œuvre, notamment en raison du maintien du caractère mâle stérile qui nécessite la resélection de plantes mâles stériles dans les descendants obtenus par autofécondation d'une plante hétérozygote pour le gène de stérilité mâle récessif. Pour être efficace, ce système implique donc l'utilisation d'un marqueur étroitement  
10 lié au gène de stérilité mâle et facilement identifiable.

La stérilité mâle peut être "acquise", c'est-à-dire qu'elle est indépendante d'une quelconque manipulation génétique par la voie de l'ADN recombinant. On peut distinguer la stérilité mâle cytoplasmique de la stérilité mâle nucléaire.

15 La stérilité mâle "cytoplasmique" ("CMS") est liée à des changements dans l'organisation et l'expression du génome mitochondrial, la stérilité mâle nucléaire résulte de mutations dans le génome du noyau de la cellule. Cependant la CMS n'est pas complète, 2/1000 des plantes restant fertiles. La perte de la diversité génétique cytoplasmique lorsque les sélectionneurs utilisent le même cytoplasme dans leurs  
20 programmes de sélection peut être par ailleurs un handicap.

La stérilité mâle peut être "artificielle" ("AMS"), c'est-à-dire qu'elle est induite par l'expression d'un gène conférant la stérilité mâle (gène AMS) qui est inséré soit dans le génome mitochondrial (stérilité mâle cytoplasmique), soit dans le génome nucléaire (stérilité mâle nucléaire).

25 Le système AMS permet d'éviter les problèmes associés aux autres méthodes. En effet, contrairement à la CMS, le système AMS ne dépend pas de l'existence d'un mutant. Le maintien du caractère stérile de la lignée mâle peut être obtenu grâce à l'utilisation d'un gène de stérilité mâle dominant lié à un gène marqueur qui permet la sélection des plantes mâles stériles artificielles.

30 Le problème du maintien du caractère mâle stérile dans une lignée de plantes a été en partie résolu dans la demande de brevet WO 95/34634 qui prévoit le croisement entre une plante hétérozygote pour un gène dominant de stérilité mâle et une plante restauratrice de la fertilité puis la sélection des semences mâles stériles. Dans cette demande, l'utilisation d'un marqueur, lié au gène restaurateur de la

fertilité, influant sur la régulation des gènes codant les enzymes de régulation de la synthèse des anthocyanes permet de différencier par la couleur les semences mâles stériles des semences mâles fertiles.

Cependant, le système de tri décrit dans cette demande de brevet ne permet pas de réaliser de façon fiable un tri de semences hybrides à grande échelle.

D'autre part, l'application générale de cette technologie est limitée dans la mesure où le choix du marqueur de coloration est conditionné par le génotype de la plante contenant le gène de restauration de la fertilité. En particulier, seules des plantes dont le génotype ne conditionne pas une production visible d'anthocyanine dans les semences peuvent être utilisées.

La présente invention propose donc un procédé de production et de multiplication de plants de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle, permettant une production de semences hybrides, et facilement applicable à grande échelle. Un avantage du procédé proposé est que son application n'est pas conditionnée par le génotype des plantes utilisées.

Cette approche repose notamment sur l'association du caractère de fertilité à un phénotype "petit grain". Le phénotype "petit grain" est préférentiellement obtenu par l'expression des gènes *shrunk 2* et *brittle 2* en orientation antisens. Le gène *brittle 2* en orientation antisens code l'une des 2 sous-unités de l'ADP pyrophosphatase, une enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. Le fragment a été obtenu par la technique de RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN totaux d'épi de maïs et d'après les données de Genbank (n° acc. S72425). Ce fragment représente un ADNc incomplet du gène *brittle 2*. Le gène *shrunk 2* en orientation antisens code l'autre sous-unité de l'ADP pyrophosphatase. Le fragment a été obtenu par la technique de RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN totaux d'épi de maïs et selon les données de Genbank (n° acc. S72425). Ce fragment contient la séquence complète de la région codante du gène *shrunk 2*.

L'inhibition de ces deux gènes de mutants ridés de taille et de poids inférieurs permet d'obtenir des grains de maïs de taille inférieure. De tels grains peuvent être facilement triés par tamisage et/ou par une table densimétrique, ce qui permet la mise en œuvre d'une sélection fiable, simple, et automatisée et donc applicable à grande échelle.

Dans le cadre de la présente invention, on désigne par "hétérozygote pour le transgène AMS" un plant de maïs rendu mâle stérile par incorporation dans son génome d'une seule copie d'un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"). En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

Dans le cadre de la présente invention, on désigne par "homozygote pour le transgène AMS" un plant de maïs rendu mâle stérile par incorporation dans son génome de deux copies situées au même endroit sur chacun des chromosomes frères d'un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS). En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

Par "plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain"" on entend un plant de maïs hétérozygote ou homozygote pour ledit gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Préférentiellement, ledit plant de maïs est hétérozygote. En l'absence d'autre indication, ce plant ne contient pas de transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS).

Par "plant de maïs comprenant dans son génome un transgène AMS" on entend un plant de maïs hétérozygote ou homozygote pour ledit transgène AMS.

Par "plant de maïs de génotype sauvage", on entend un plant de maïs qui ne contient dans son génome ni un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle (AMS), ni un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". De manière préférentielle, ledit plant de maïs de génotype sauvage appartient à une lignée élite.

Par phénotype "petit grain" on entend des grains dont la densité et/ou la taille et/ou la masse est (sont) inférieure(s) à celle(s) d'un grain de taille normale, préférentiellement de 40 à 50 % inférieure. Dans le cadre de la présente invention, ces grains pourront être appelés "grains déprimés" ou "grains ridés"

Par "grain de taille normale" ou "grain normal" ou "grain de phénotype normal", on entend notamment un grain dont la taille et/ou la densité et/ou la masse n'a(n'ont) pas été modifiée(s), en particulier par intégration dans le génome de la plante d'un marqueur de phénotype "petit grain".

Par "lignée élite", on entend une lignée présentant un potentiel agronomique et commercial important, à une période donnée.

L'un des buts de l'invention est donc de proposer un procédé de production de semences hybrides de maïs par croisement d'un plant de maïs hétérozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") avec un plant de maïs de génotype sauvage. Le système selon la présente invention, qui permet avantageusement de maintenir le caractère mâle stérile de plants de maïs est applicable indépendamment du génotype des plants de maïs utilisés.

La solution apportée par l'invention consiste à produire dans un premier temps des semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". A partir de ces semences, les sélectionneurs peuvent aisément introgresser le génotype homozygote pour le transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" dans une lignée de maïs de génotype sauvage, et en particulier dans une lignée élite d'intérêt, par rétrocroisements successifs. Une lignée élite reconvertie homozygote pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" peut ainsi être obtenue. L'autofécondation de plants de maïs issus de ces semences permet ensuite de produire :

- des semences homozygotes pour le transgène AMS générant des plants de maïs mâles stériles qui, croisés avec des plants de maïs de génotype sauvage, et en particulier des plants appartenant à une lignée élite utilisée pour la reconversion, le cas échéant, produiront des semences hétérozygotes pour le transgène AMS. La fécondation de plants de maïs mâle stériles issus de ces semences par un plant de maïs de génotype sauvage, non-apparenté, produit alors des semences hybrides bénéficiant de l'effet de vigueur (hétérosis),

- des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes ou homozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", générant des plants de maïs non mâles stériles dont l'autofécondation produit notamment des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à



un marqueur de phénotype "petit grain", assurant ainsi le renouvellement des plants de maïs mâles stériles d'intérêt.

Dans le cadre de la présente invention, une sélection des semences de maïs  
5 par le phénotype "petit grain" peut notamment être mise en œuvre par une méthode de tri dimensionnel ou densimétrique.

Un tri dimensionnel peut être réalisé de manière à séparer les grains en fonction de leur longueur, en utilisant par exemple un trieur à alvéoles, de leur largeur, avec par exemple un trieur à disques, ou de leur épaisseur, en utilisant par  
10 exemple un calibreur.

Le principe d'un tri densimétrique repose sur une séparation des grains selon leur densité et utilise notamment une colonne densimétrique ou une table densimétrique.

Plus particulièrement, une table densimétrique permet de séparer des corps de  
15 mêmes dimensions mais de poids spécifique différent. Le poids spécifique correspond à une mesure de la masse d'une quantité de semences par rapport à son volume. Le principe de l'appareil est un plan de travail traversé par un flux d'air uniforme qui fluidifie le mélange de semences et en provoque la stratification schématiquement en deux couches. Les produits lourds restent près de la table, les  
20 produits légers au-dessus. La séparation des deux couches est obtenue par réglage de l'inclinaison du plan de travail (dans deux directions) et par un mouvement d'agitation de va-et-vient transversal. On pourra par exemple utiliser une table densimétrique telle que celle commercialisée par la société HEID-AGRARTEHNIK (Stockerau, Autriche).

25

La présente invention propose donc un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

30 a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),

d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

De façon préférentielle, au moins une étape de sélection du procédé comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison. L'étape de sélection ainsi effectuée présente l'avantage de permettre un tri facilement réalisable et automatisable des grains en fonction de leur phénotype "petit grain" ou "normal".

Selon un mode particulier de réalisation, l'étape b) du procédé décrit ci-dessus peut être avantageusement remplacée par une étape de génotypage. La présente invention propose donc également un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS

avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a)

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b)

d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

La mise en œuvre des procédés décrits ci-dessus permet de produire une semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". La présente invention vise donc une semence de maïs homozygote pour un transgène

AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" susceptible d'être obtenue par l'un des procédés précédents. De manière préférentielle, le génotype AMS homozygote et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" peut être introgressé dans une lignée de maïs de génotype sauvage, et en particulier dans une lignée élite d'intérêt, par rétro-croisements successifs.

La mise en culture, puis l'auto-fécondation des plants de maïs obtenus à partir de semences ci-dessus (homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain") produit des semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS, ainsi que des semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes ou homozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS sont facilement différenciables des autres semences ainsi produites car elles seules présentent des grains de phénotype normal.

La présente invention propose donc un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprenant les étapes consistant à :

- a) auto-féconder des plants de maïs issus de semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenues par l'un des procédés précédemment décrits,
- b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

De façon préférentielle l'étape de sélection comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantageusement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprend les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son

génomique un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

- b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),
- d) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),
- f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

L'étape e) de ce procédé pourra éventuellement être précédée d'une étape de rétrocroisements successifs avec un plant de maïs de génotype sauvage, et en particulier, un plant de maïs appartenant à une lignée élite, de manière à reconvertir ce plant de maïs de génotype sauvage avec le génotype homozygote pour le transgène AMS et hétérozygote pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences issues de cette étape de rétrocroisement sont alors utilisées pour la poursuite du procédé.

De façon préférentielle, au moins une étape de sélection, et en particulier l'étape f), comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantageusement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

Selon une autre variante, l'étape b) du procédé ci-dessus est remplacée par une étape de génotypage. La présente invention a donc également trait à un procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") comprenant les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a),

- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),
- f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

L'étape e) de ce procédé pourra éventuellement être précédée d'une étape de rétrocroisements successifs avec un plant de maïs de génotype sauvage, et en particulier, un plant de maïs appartenant à une lignée élite, de manière à reconvertir ce plant de maïs de génotype sauvage avec le génotype homozygote pour le transgène AMS et hétérozygote pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les semences issues de cette étape de rétrocroisement sont alors utilisées pour la poursuite du procédé.

De façon préférentielle, au moins une étape de sélection, et en particulier l'étape f), comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison. Cette étape permet avantageusement de trier les semences homozygotes pour le transgène AMS par leur phénotype de grain normal.

La mise en culture de semences homozygotes pour le transgène AMS permet alors de générer des plants de maïs mâles stériles qui, croisés avec des plants de génotype sauvage, et en particulier avec des plants appartenant à une lignée élite, produisent des semences hétérozygotes pour le transgène AMS. La lignée élite utilisée pour ce croisement peut en particulier être celle utilisée pour l'étape de rétrocroisement éventuellement mise en œuvre dans les procédés précédents. Dans ce cas, les semences produites peuvent servir à produire des semences commerciales issues d'un hybride de maïs. Selon un autre mode de réalisation, la lignée élite WT peut être remplacée par un hybride de maïs pour obtenir des semences qui serviront à produire un hybride de trois voies.

La présente invention concerne donc également un procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS comprenant le croisement d'un plant de maïs issu d'une semence homozygote pour un transgène AMS, susceptible d'être obtenue par l'un des procédés de production d'une semence homozygote pour

le transgène AMS décrits précédemment, avec un plant de maïs de génotype sauvage.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS est caractérisé en ce que l'un des procédés de production d'une semence homozygote pour le transgène AMS décrits précédemment comprend en outre le croisement d'un plant de maïs issu de ladite semence homozygote pour un transgène AMS avec un plant de maïs de génotype sauvage.

La fécondation de plants de maïs mâle stériles issus de ces semences par un plant de maïs de génotype sauvage, non-apparenté, produit avantageusement des semences hybrides bénéficiant de l'effet de vigueur (hétérosis).

Selon un autre aspect, le système proposé par la présente invention permet avantageusement de maintenir des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain". Les procédés de production de semences de maïs homozygotes pour le transgène AMS décrits ci-dessus comprennent en effet une sélection finale de semences notamment sur la base de leur phénotype de grain normal. Les semences de phénotype "petit grain" non sélectionnées par ces procédés peuvent être semées, puis les plants générés auto-fécondés, produisant ainsi notamment des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

L'invention concerne donc un procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" comprenant les étapes consistant à :

- a) autoféconder des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenus à partir d'une semence d'un des procédés de production de semences homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" précédemment décrits,

- b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et de phénotype "petit grain",
- c) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" obtenues par autofécondation des plants de maïs obtenus à partir des semences obtenues selon l'étape b).

De façon préférentielle, l'étape b) du procédé ci-dessus comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison.

La présente invention a également pour objet des constructions nucléotidiques, appelées cassettes d'expression, comprenant une séquence nucléotidique promotrice liée de manière opérante à au moins un gène d'intérêt.

Ledit gène d'intérêt peut être également associé à d'autres éléments de régulation tels que des activateurs et des séquences de terminaison de transcription (terminateurs). D'autres éléments tels que les introns, enhancers, séquences de polyadénylation et dérivées peuvent également être présents dans la séquence nucléique d'intérêt, pour améliorer l'expression ou le fonctionnement du gène transformant. La cassette d'expression peut aussi contenir des séquences 5' non traduites dites "leader". De telles séquences peuvent améliorer la traduction.

20

De façon préférentielle, dans les procédés de production de semences précédemment décrits, le plant de maïs comprenant un transgène AMS conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle est caractérisé en ce que le transgène AMS, de préférence le gène barnase (Hartley, 1988 ; Gene Bank n°X 12871), est compris dans une cassette d'expression, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse et d'un terminateur, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur.

Le promoteur spécifique de la pollénogenèse est notamment un promoteur permettant une expression spécifique dans l'anthere choisi parmi le groupe consistant en le promoteur A3 (WO 92 11379), le promoteur A6, le promoteur A9 (WO 92 11379), correspondant à la région 5' non codante du gène A9 d'*Arabidopsis thaliana*, et les promoteurs spécifiques du tapis de l'anthere tels que TA29, TA26, TA13 (WO 89 10396) ou Mac2 (WO 00 68 403).

Parmi les gènes codant un agent de sélection, peuvent être notamment utilisés des gènes qui confèrent une résistance à un antibiotique tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil. Préférentiellement, ledit gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar (White et al., 1990 ; Gene Bank n° X 17220) qui confère la résistance à l'herbicide Basta® (glufosinate) et le gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine (Bevan et al., 1983).

Selon un mode préféré, ledit gène est compris à l'intérieur de l'élément transposable Ds. Le transposon Ds utilisé est décrit dans la publication de Yoder et al., (1993). L'élément Dans est un élément Ac qui a subi d'importantes mutations ou délétions dans la séquence codant la transposase. Il ne peut s'exciser de son site d'insertion qu'en présence d'une source de transposase active Ac. Il est donc Ac dépendant. Un système préféré d'élimination de gène marqueur de sélection peut comprendre deux composantes :

- une première plante ne possédant aucune transposase active, dans laquelle un construit comprenant la cassette d'expression du gène d'intérêt et celle du gène codant un agent de sélection encadré par les séquences mobilisables d'un transposon peut y être intégré.
- une deuxième plante contenant dans son génome un gène codant une transposase active endogène.

Le croisement de ces deux plantes conduit à l'obtention de régénérants, obtenus à partir de plantes F1 ou de plantes F2 sélectionnées pour la présence du gène d'intérêt sans gène marqueur de sélection.

Préférentiellement selon l'invention, le promoteur associé au gène codant un agent de sélection est un promoteur constitutif, tel que le promoteur Actine-Intron-actine, correspondant à la région en 5' non codante du gène de l'actine 1 du riz et son premier intron (Mc Elroy et al., 1991 ; Gene Bank n° S 44221). La présence du premier intron actine permet d'augmenter le niveau d'expression d'un gène lorsqu'il est fusionné en 3' d'un promoteur. Cette séquence promotrice permet par exemple l'expression constitutive du gène bar.

Parmi les terminateurs pouvant être utilisés avec le transgène AMS ou le gène codant un agent de sélection, on peut notamment citer :

- le terminateur 3' Nos, terminateur de la nopaline synthase qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase provenant du



plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982); et

- le terminateur 3' CaMV, correspondant à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck et al. 1980 ; Gene Bank n° V 00141).

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié génétiquement à au moins un gène codant un phénotype "petit grain", associés à des éléments permettant leur expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.

Parmi les promoteurs de transcription pouvant être utilisés en association avec le gène codant un phénotype "petit grain", on peut notamment citer :

- le promoteur HMWG (High Molecular Weight Glutenin) correspondant à la région 5' non codante du gène de la gluténine du blé (*Triticum aestivum*), une protéine de réserve de l'albumen. Ce promoteur, spécifique de la semence, est décrit dans la publication de Robert et al. (1989),
- le promoteur B32 (Di Fonzo N et al.) 1988.

De façon préférentielle, ladite cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié génétiquement à au moins un gène codant un phénotype "petit grain", est caractérisée en ce que ledit gène restaurateur de la fertilité est le gène barstar (Hartley, 1998) placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos.

Parmi les gènes codant un agent de sélection, peuvent être notamment utilisés des gènes qui confèrent une résistance à un antibiotique tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil. Préférentiellement, ledit gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar qui confère la résistance à l'herbicide Basta® et le gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine.

Préférentiellement, le gène codant un phénotype "petit grain" est choisi parmi les gènes shrunken 2 et brittle 2 en orientation antisens.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un vecteur, notamment un plasmide, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cassette d'expression telle que décrite précédemment.

5 L'invention porte en outre sur un hôte cellulaire, notamment une bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par ledit vecteur. Un tel hôte cellulaire est utile pour transfecter des cellules de maïs avec un vecteur selon l'invention.

10 L'invention concerne donc également une cellule de maïs transformée par un au moins un vecteur tel que décrit précédemment. La transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert des vecteurs susmentionnés dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol (PG) en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) selon la méthode décrite dans l'article de Krens et al. (1982).

15 La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et al. (1986).

20 La transformation des cellules végétales peut encore être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Finer et al. (1992).

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

25 Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

30 Avantagusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan (1984) et d'An et al. (1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al. (1987).

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al., 1994).

5 Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir*,  
10 nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

La présente invention a également pour objet de produire des plants de maïs transgéniques, parties de plante ou extraits de plante, caractérisés en ce qu'ils sont  
15 régénérés à partir de la cellule de plante transformée.

L'invention concerne notamment un plant de maïs restaurateur de la fertilité caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un gène restaurateur de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" ou un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité  
20 lié à un marqueur de phénotype "petit grain", obtenu à partir d'une semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

L'invention vise également un kit pour la mise en œuvre d'un procédé de  
25 multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" précédemment décrit, caractérisé en ce qu'il comprend des semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", et  
30 des oligonucléotides spécifiques transgènes AMS utiles en tant qu'amorces pour la détection par PCR des semences homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

Les exemples et figures suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée :

### **LEGENDE DES FIGURES**

La figure 1 représente le schéma de principe d'une succession d'étapes conduisant à la production d'une semence hybride selon l'invention.

La figure 2 représente le plasmide pRec 274 comprenant le gène barnase, conférant la stérilité mâle, et le gène bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta®.

La figure 3 représente le plasmide donneur pBIOS 274 comprenant le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase, sous le contrôle du promoteur A9, et du gène bar, sous le contrôle du promoteur Actine de riz.

La figure 4 représente le plasmide donneur pBIOS 424 comprenant le promoteur A9-barnase-terminateur 3' CaMV et le gène de résistance à la kanamycine NptII dans un élément dissociant Ds.

La figure 5 représente le plasmide p3222 comprenant la séquence antisens du gène brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 6 représente le plasmide p3223 comprenant la séquence antisens du gène shrunk 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 7 représente le plasmide p4962 comprenant les séquences antisens des gènes shrunk 2 et brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.

La figure 8 représente le plasmide pDM 302 comprenant la cassette d'expression du gène bar.

La figure 9 représente le plasmide donneur pBIOS 273 qui comporte une cassette d'expression comprenant le promoteur Actine de riz, le gène Bar, et le terminateur 3'Nos.

### **EXEMPLES :**

Une illustration non limitante d'un des procédés selon la présente invention est décrite dans la figure 1.

La construction des différents plasmides ainsi que leur ligation et la transformation des bactéries *Escherichia coli* XLI blue rendues préalablement compétentes, est réalisée grâce aux techniques usuelles d'ADN recombinant (Sambrook et al., 1989).

La construction des vecteurs d'expression et les techniques de transformation utilisées sont à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standard.

### **EXEMPLE 1 : construit AMS**

**1.a) : Construction d'un plasmide (pRec 274) comprenant le gène barnase, conférant la stérilité mâle, lié au gène bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta® :**

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb (pRec 274).

Le vecteur superbinaire utilisé pour la transformation contient :

- une région ori : origine de réplication plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*. Cette origine de réplication n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*,

- une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,

- la région cos du bactériophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,

- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent l'efficacité de transformation,

- les gènes de résistance à la tétracycline (Tetra) et à la spectinomycine (Spect) qui s'expriment uniquement dans les bactéries,

- un ADN-T porteur des gènes barnase, conférant la stérilité mâle, et bar, conférant la résistance à l'herbicide Basta®, ces deux gènes étant opérationnellement liés à des éléments permettant leur transcription. Dans le présent exemple, le gène barnase est sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3' CaMV ; le gène bar étant sous le contrôle du promoteur actine-intron actine de riz et du terminateur 3' Nos.

Le gène bar de *Streptomyces hygroscopicus* code une Phosphinothricine Acyl Transférase (PAT) qui détoxifie la phosphinothricine (agent de sélection de l'herbicide Basta®) par acétylation (White et al., 1990). Il est généralement utilisé

pour sélectionner des plantes transformées qui contiennent à la fois le gène d'intérêt et ce gène codant un agent de sélection, et qui sont donc résistantes à l'herbicide.

Le gène barnase, qui confère la stérilité mâle, code une Ribonucléase (RNase). Ce gène a été isolé à partir de *Bacillus amyloliquefasciens* et est décrit dans la publication de Hartley (1988).

Le plasmide superbinaire pRec 274 est représenté dans la Figure 2.

Ce vecteur superbinaire est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec un plasmide donneur pBIOS 274 (Figure 3), dérivé de pUC (Messing, 1983).

Le plasmide donneur possède le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase, sous le contrôle du promoteur A9, et du gène bar, qui est aussi un gène de sélection, sous le contrôle du promoteur Actine de riz.

Les plasmides donneur et accepteur possèdent une région d'homologie suffisante pour permettre une recombinaison homologue et obtenir le vecteur dit superbinaire.

La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* permet l'intégration du seul ADN-T constitué des bordures droite (RB) et gauche (LB) encadrant le gène d'intérêt (barnase) et le gène codant un agent de sélection.

### **1.b) Construction d'un plasmide (pRec 424) comprenant le gène barnase conférant la stérilité mâle lié au gène NPT-II conférant la résistance à la kanamycine.**

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb (pRec 424).

Le vecteur superbinaire utilisé pour la transformation contient :

- une région ori : origine de réplication plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*. Cette origine de réplication n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*,
- une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,

- la région cos du bactériophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,

- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent l'efficacité de transformation,

5 - les gènes de résistance à la tétracycline (Tetra) et à la spectinomycine (Spect) qui s'expriment uniquement dans les bactéries,

- un ADN-T porteur des gènes barnase, conférant la stérilité mâle, et NptII inséré dans un élément Ds, conférant la résistance à la kanamycine, ces deux gènes étant opérationnellement liés à des éléments permettant leur transcription. Dans le  
10 présent exemple, le gène barnase est sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3' CaMV ; le gène NptII inséré dans un élément Ds étant sous le contrôle du promoteur Actine et du terminateur et du terminateur 3' Nos.

15 Le gène NptII a été isolé à partir du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* (Berg et al. 1983). Ce gène code pour l'enzyme néomycine phosphotransférase de type II qui catalyse la O-phosphorylation d'antibiotiques aminoglycosides tels que néomycine, kanamycine, gentamycine et G418 (Davies et Smith, 1978). Ce gène confère la résistance à la kanamycine, qui est utilisée comme agent de sélection lors de la transformation génétique végétale. Il est décrit par Bevan et al. (Genbank  
20 n°U00004).

Le gène barnase, qui confère la stérilité mâle, code une Ribonucléase comme mentionné dans l'exemple 1.a ci-dessus.

25 Ce vecteur superbinaire est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec un plasmide donneur pBIOS 424 (Figure 4) dérivé de pUC (Messing, 1983).

30 Le plasmide donneur pBIOS 424 possède le gène de résistance à la spectinomycine ainsi que l'ADN-T porteur du gène barnase sous le contrôle du promoteur A9 et du gène NptII mis sous le contrôle du promoteur Actine inséré dans un élément Ds.

Le plasmide donneur pBIOS 424 (promoteur A9-barnase-terminateur 3' CaMV et le gène de résistance à la kanamycine NptII dans un élément dissociant Ds) a été généré de la manière suivante :

Le fragment contenant la cassette promoteur A9 - gène barnase – terminateur 3' CaMV a été isolé par

- a) restriction avec *Xho*I,
- b) traitement à la T4 DNA Polymérase pour générer des bouts francs, et
- c) restriction avec *Xba*I à partir du plasmide pBIOS 274 (Figure 3).

Ce fragment (*Xho*I/blunt – *Xba*I) a ensuite été introduit dans le vecteur pBIOS 415 (décrit ci-dessous) ouvert à l'aide des enzymes de restriction *Eco*RV et *Xba*I.

Le fragment *Eco*RV-*Xba*I ainsi généré contient les séquences plasmidiques du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) et la cassette élément Ds – promoteur Actine - intron actine – gène NPTII – terminateur Nos – élément Ds.

Le plasmide pBIOS 415 contient le gène de la GFP sous contrôle du promoteur CsVMV (WO 97/48819) et du terminateur Nos (fragment *Xba*I – *Xho*I) dans le vecteur accepteur pBIOS 340. Le vecteur pBIOS 340 est un vecteur contenant les séquences plasmidiques du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) et la cassette élément Ds – promoteur Actine - intron actine – gène NPTII – terminateur Nos – élément Ds.

Les plasmides donneur et accepteur possèdent une région d'homologie suffisante pour permettre l'obtention du vecteur dit superbinaire par recombinaison homologue.

La technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* permet l'intégration du seul ADN-T constitué des bordures droite (RB) et gauche (LB) encadrant le gène d'intérêt (gène barnase) et le gène codant pour un agent de sélection.



**EXEMPLE 2 : Construit Restaurateur-Marqueur phénotypique lié à la taille du grain.**

**2.a) Construction d'un plasmide (p3222, figure 5) comprenant la séquence antisens du gène brittle 2 ainsi que le gène barstar restaurateur de fertilité.**

Le gène brittle 2 code une sous-unité de la ADP Glucose Pyrophosphorylase, enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. En orientation antisens, il permet d'inhiber la synthèse de cette sous-unité ce qui produit un phénotype mutant dont la taille du grain est 50% inférieure à la taille normale.

Le gène barstar code un inhibiteur spécifique de la Barnase. Il a été isolé à partir de *Bacillus amyloliquefaciens* et est décrit dans Hartley (1998) (Genbank N° X15545).

Le plasmide p3222 est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène brittle 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur A9, le gène Barstar et le terminateur CaMV.

Le gène brittle 2 a été synthétisé par PCR à partir d'ADNc d'albumen de maïs avec les oligonucléotides Bt5 (CCGGATCCATGTGACAGACAGTGTTA, SEQ ID n°1) contenant un site BamHI, et Bt3 (AAGCCCGGGACTTGTACTAACTGTTTC, SEQ ID n°2) contenant un site SmaI.

Le fragment PCR de 600 pb ainsi obtenu a été digéré par SmaI et BamHI et cloné entre le promoteur HMWG et la région terminatrice nos du plasmide p3214 ouvert par SmaI et BamHI. Le plasmide p3215 ainsi obtenu contient la cassette d'expression promoteur HMWG-brittle 2 (orientation antisens)-nos.

Un fragment de 270 pb contenant le gène barstar a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWP127 avec les oligonucléotides BPR5 (TATCGGATCCAAATCATAAGAAAGGAG, SEQ ID n°3) contenant un site BamHI, et BPR4 (GAAGATCTATATTGTTTCATCCATTG, SEQ ID n°4) contenant un site BglII. Le fragment PCR ainsi obtenu a été digéré avec BamHI et BglII et cloné entre le promoteur A9 et la région terminatrice CaMV du plasmide p1415 ouvert par BamHI. Le plasmide p3072 ainsi obtenu contient le gène barstar sous le contrôle du promoteur A9 et de la région terminatrice CaMV.

Le plasmide p3222 selon l'exemple 2.a) correspond à l'insertion de la cassette promoteur HMWG-brittle 2 (orientation antisens)-nos (fragment KpnI-SacI) de p3215 dans p3072 ouvert avec KpnI et SacI.

5        **2.b) Construction d'un plasmide (p3223, figure 6) comprenant la séquence antisens du gène shrunken 2 ainsi que le gène barstar restaurant la fertilité.**

10        Le gène shrunken 2 code l'autre sous-unité de la ADP Glucose Pyrophosphorylase, enzyme intervenant dans la synthèse de l'amidon. En orientation antisens, il permet d'inhiber la synthèse de cette sous-unité ce qui produit un phénotype mutant dont la taille du grain est 40% inférieure à la taille normale.

15        Le plasmide p3223 est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène shrunken 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur A9, le gène Barstar et le terminateur CaMV.

20        Le gène shrunken 2 a été synthétisé par PCR à partir d'ADNc d'albumen de maïs avec les oligonucléotides New Sh5 (GCACCCGGGAGGAGATATGCAGTTTG, SEQ ID n°5) contenant un site SmaI, et Sh3 (GACTGCAGCACAAATGGTCAAG, SEQ ID n°6) contenant un site PstI.

25        Le fragment PCR de 1800 pb ainsi obtenu a été digéré par SmaI et PstI et cloné entre le promoteur HMWG et la région terminatrice nos du plasmide p3214 ouvert par SmaI et PstI. Le plasmide p3217 ainsi obtenu contient la cassette d'expression promoteur HMWG-shrunken 2 (orientation antisens)-nos.

30        Un fragment de 270 pb contenant le gène barstar a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWP127 avec les oligonucléotides BPR5 (TATCGGATCCAAATCATAAGAAAGGAG, SEQ ID n°7) contenant un site BamHI, et BPR4 (GAAGATCTATATTGTTTCATCCCATTTG, SEQ ID n°8) contenant un site BglII. Le fragment PCR ainsi obtenu a été digéré avec BamHI et BglII et cloné entre le promoteur A9 et la région terminatrice CaMV du plasmide p1415 ouvert par BamHI. Le plasmide p3072 ainsi obtenu possède le gène barstar sous le contrôle du promoteur A9 et de la région terminatrice CaMV.

Le plasmide p3223 selon l'exemple 2.b) correspond à l'insertion de la cassette promoteur HMWG-shrunken 2 (orientation antisens)-nos (fragment KpnI-SacI) de p3217 dans p3072 ouvert avec KpnI et SacI.

**2.c) Construction d'un plasmide (pRec 4962) comprenant les séquences antisens des gènes *shrunk* 2 et *brittle* 2 ainsi que le gène *barstar* restaurateur de fertilité.**

5

Le plasmide p4962 (figure 7) est porteur de deux cassettes d'expression clonées individuellement. La première cassette comprenant le promoteur HMWG, le gène *shrunk* 2 en orientation antisens, le gène *brittle* 2 en orientation antisens et le terminateur Nos. La seconde cassette comprenant le promoteur Mac2.1, le gène Barstar et le terminateur CaMV. Ce plasmide a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques connues de l'homme de l'art.

Le plasmide p4962 se présente sous la forme d'un vecteur donneur dérivé du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) d'environ 11,7 kb comprenant :

- une région ori : origine de répllication plasmidique Col E1, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans la bactérie,
- un gène de résistance à la spectinomycine s'exprimant uniquement dans les bactéries,
- un T-DNA comprenant le gène de restauration de la fertilité mâle (gène *barstar*) et les séquences antisens des gènes *shrunk* 2 et *brittle* 2 conférant un phénotype 'petit grain'.

20

Dans le présent exemple, le gène *barstar* est sous le contrôle du promoteur Mac2.1 et du terminateur 3'CaMV, les gènes *shrunk* 2 et *brittle* 2 en orientation antisens étant sous le contrôle du promoteur HMWG et du terminateur 3'Nos.

Le vecteur superbinaire pRec4962 est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (Japan Tobacco, EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec le plasmide donneur p4962.

25

**EXEMPLE 3 : Plasmide de sélection**

30

**3.a) Construction d'un plasmide (pDM302, figure 8) comprenant le gène *bar* conférant la résistance à l'herbicide Basta® utilisé comme plasmide de sélection en cotransformation avec le plasmide restaurateur.**

Comme indiqué dans l'exemple 1, le gène bar permet de sélectionner les plantes transformées qui sont résistantes à l'herbicide Basta®.

Le plasmide pDM302 (Cao et al., 1992) est porteur de la cassette d'expression comprenant le promoteur Actine-Intron-actine, le gène Bar et le terminateur Nos.

5 Ce plasmide pDM302 a été obtenu de la manière suivante :

La région codante du gène bar de *Streptomyces hygroscopicus* codant pour l'activité PAT (Phosphinothricine Acétyl Transférase) a été excisée du plasmide pIJ4104 (White et al., 1990) par l'enzyme de restriction SmaI (fragment de 600 pb) et cloné dans le vecteur d'expression pCOR113 (McElroy et al., 1991) derrière le  
 10 fragment 5' (promoteur et premier intron) du gène Actine 1 (Act-1) de riz. Ceci a généré le plasmide pDM301 de 4.9 kb contenant la cassette d'expression Act1-bar. La cassette d'expression Act1-bar de pDM301 a été excisée en tant que fragment de restriction XhoI-XbaI de 2.0 kb et cloné entre les sites Sall et XbaI en amont de la séquence terminatrice du gène nos codant la nopaline synthase (plasmide pNOS72).  
 15 Le plasmide pDM302 de 4.7 kb ainsi obtenu contient la cassette d'expression Act1-bar-nos.

20 **3.b) Construction d'un plasmide pRec 273 comprenant le gène bar conférant la résistance à l'herbicide Basta® utilisé comme plasmide de sélection en co-transformation avec le plasmide restaurateur.**

Le plasmide pBIOS 273 (Figure 9) est porteur d'une cassette d'expression comprenant le promoteur Actine de riz, le gène Bar, et le terminateur 3'Nos. Ce plasmide a été construit par des techniques de biologie moléculaire classiques  
 25 connues de l'homme de l'art.

Le plasmide pBIOS 273 se présente sous la forme d'un vecteur donneur dérivé du vecteur pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752), d'environ 8,6 kb comprenant :

- une origine ori : origine de réplication plasmidique Col E1, nécessaire au  
 30 maintien et à la multiplication du plasmide dans la bactérie,
- un gène de résistance à la spectinomycine s'exprimant uniquement dans les bactéries,
- un T-DNA comprenant le gène Bar conférant la résistance à l'herbicide Basta® sous le contrôle du promoteur Actine de riz et du terminateur 3' Nos.

Le plasmide pBIOS 273 a été généré en deux étapes :

- clonage du fragment BspDI/XhoI (promoteur Actine – gène Bar - terminateur Nos) du vecteur pDM 302 (Cao et al. 1992) dans les sites SmaI et BspDI du vecteur pSB12 (Japan Tobacco EP 672 752). Le vecteur résultant de ce clonage est appelé pBIOS 272.

- délétion du site XhoI en position 3363 du vecteur pBIOS 272 par digestion partielle avec XhoI et action de l'ADN Polymerase I, large (Klenow) fragment. Le vecteur obtenu, possédant un site unique XhoI, est nommé pBIOS 273.

Le vecteur superbinaire pRec 273 est obtenu par recombinaison homologue d'un plasmide accepteur pSB1 (Japan Tobacco, EP 672 752) dérivé d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* avec le plasmide donneur pBIOS 273.

#### **EXEMPLE 4 : Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS**

##### ***4.a) Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS (AMS/+) par transformation du maïs avec le plasmide décrit selon l'exemple 1a (pRec 274).***

Une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote exprimant les gènes barnase (conférant la stérilité mâle) et bar (résistance au glufosinate) respectivement sous contrôle des promoteurs A9 (Paul et al., 1992) et actine-intron (Mc Elroy et al., 1991) est obtenue par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* selon la méthode décrite par Ishida et al. (1996).

Dans l'exemple suivant, la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) a été produite par la méthode de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres techniques de transformation connues de l'homme de l'art peuvent être utilisées.

### Obtention et préparation du matériel végétal :

Des épis de maïs sont décontaminés durant 15 à 20 minutes dans du Domestos 20% sous agitation et ensuite rincés à l'eau stérile avant de prélever les embryons immatures qui sont placés dans du milieu LSinf. La taille des embryons immatures optimale est de 1 à 1,2 mm, ce qui correspond à 10 +/- 2 jours après fécondation. Les embryons sont ensuite agités au vortex, le milieu LSinf est éliminé, et un rinçage dans du milieu LSinf est effectué avant d'agiter au vortex à nouveau.

### Préparation des bactéries :

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA 4404) contenant le plasmide super binaire pRec 274 (comme décrit selon exemple 1a) sont mises en culture dans du milieu YP supplémenté avec un agent sélectif approprié à la souche. 2 à 3 jours après, les bactéries sont mises en suspension dans du milieu LSinf + acétosyringone 100 µM. La concentration de l'inoculum est considérée à  $1.10^9$  bactéries/ml.

### Inoculation et coculture :

Après avoir éliminé le milieu LSinf, les embryons sont mis en contact avec les Agrobactéries. Après avoir agité au vortex, 50 µl de Pluronic F68 à 1% sont rajoutés et une incubation de 5 minutes à température ambiante est effectuée. L'inoculum est éliminé et les embryons sont récupérés et placés sur milieu 1,5LSAs, scutellum vers le haut. Après avoir scellé la boîte, une incubation de 5 jours à 25°C à l'obscurité est effectuée.

### Sélection de cals transformés :

A l'issue de la coculture, les embryons sont transférés sur milieu LSD5 et placés par nombre de 25 par boîte scellée avec de l'Urgopore. Une incubation de 2 semaines à 25 °C à l'obscurité (1<sup>ère</sup> sélection) est effectuée. Une 2<sup>ème</sup> sélection consiste à transférer les embryons sur milieu LSD10 en coupant les germinations. Une incubation de 3 semaines est effectuée dans les mêmes conditions qu'en 1<sup>ère</sup> sélection. Une 3<sup>ème</sup> sélection est effectuée en excisant les -jolis- cals de type I de façon à obtenir des fragments de 1-2 mm. Une mise en culture sur milieu LSD10, puis une incubation de 3 semaines dans les mêmes conditions qu'en première et seconde sélection sont effectuées.

### Régénération de plantules transformées :

Les cals de type I ayant proliféré sont placés sur milieu LSZ2 et les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C pendant 2 semaines. Les cals de type I ayant proliféré sont à nouveau repiqués, séparés et placés sur milieu RM+G4C100. Les boîtes sont scellées avec du scellofrais® et placées en chambre de culture à 27°C. Les plantules régénérées sont repiquées sur milieu T1G4 et placées sous illumination continue, à 27°C pendant une à deux semaines. Les plantules ayant atteint un développement suffisant sont transférées au phytotron.

Afin d'identifier les plantules résistantes à l'herbicide Basta®, et donc ayant intégré le transgène, une étape de sélection est effectuée avec une solution Basta F1 (AgrEvo France). L'application de cette solution se fait par spray sur les plantes de maïs au stade 4-5 feuilles. La concentration en glufosinate d'ammonium de la solution de traitement est de 0,75 grammes par litre.

Les plantes résistantes présentent une zone non nécrosée 5 jours après l'application de l'herbicide. Les plantes sensibles présentent une nécrose de la zone traitée qui s'étend par la suite à la feuille entière (mort des tissus chlorophylliens).

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

#### ***4.b) Production d'une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS (AMS/+) par transformation du maïs avec le plasmide décrit selon l'exemple 1b (pRec 424).***

25

Une lignée de maïs mâle stérile hétérozygote exprimant le gène barnase conférant la stérilité mâle, sous le contrôle du promoteur A9 (Paul et al., 1992), est obtenue par transformation avec *A. tumefaciens* selon la méthode décrite par Ishida et al. (1996). La technique de transformation avec *Agrobacterium tumefaciens*, non limitante, utilisée dans cet exemple est identique à celle utilisée dans l'exemple 4.a.

30

La transformation avec la cassette d'expression A9-Barnase-3'CaMV-Ds::NPTII comportant le gène barnase sous le contrôle du promoteur A9 et du terminateur 3'CaMV (selon l'exemple 1b) sur un vecteur utilisable en transformation via *Agrobacterium* et comportant le marqueur de sélection « Kanamycine » à l'intérieur

de l'élément transposable Ds à l'avantage d'éliminer le gène marqueur qui ne se retrouvera pas dans la lignée de maïs transformée.

#### 4.c) Caractérisation moléculaire des transformants

5

La méthodologie Southern (1975) est utilisée pour démontrer l'insertion du transgène dans le génome de la plante et pour évaluer le nombre de copies et caractériser le profil d'intégration.

10 L'ADN génomique est extrait à partir des feuilles des plantes suivant un protocole d'extraction au CTAB, selon le protocole de Keller J (DNAP 6701 San Pablo Ave Oakland CA 94608 USA) modifié par Bancroft I. (Department of MolecularGenetics, Cambridge Laboratory, John Innes Center for Plant Science Research, Colney lane, Norwich, England). L'ADN obtenu a été digéré par  
15 différentes enzymes de restriction, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et transféré sur membrane hybond N+ puis hybridé avec des sondes radioactives.

20 La sonde Bar pour les analyses moléculaires est préparée de la manière qui suit. Le plasmide pDM302 (décrit dans l'exemple 3a) de la présente invention) est digéré avec l'enzyme Sma I. Le fragment d'intérêt de 0.6 Kb est récupéré après migration du produit de digestion sur gel d'électrophorèse et purification avec le kit Gene Clean (Bio 101, Ozyme). Après marquage au P32 de 30 ng de fragment, celui ci est utilisé comme sonde pour hybrider les différents blots.

25 L'événement de transformation mâle stérile (STB27b) est un transformant obtenu par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* selon l'exemple 4a) décrit ci-dessus, et qui présente une insertion monocopie du T-DNA tel que décrit selon l'exemple 1a. Les résultats d'hybridation de l'ADN digéré par différentes enzymes de restriction (NcoI, SpeI, EcoR V, HindIII et Ecor I), puis hybridé avec la sonde Bar montrent qu'un seul fragment est mis en évidence quelle que soit l'enzyme utilisée.  
30 La taille du fragment révélé par la digestion Hind III est de 1.7 kb. Ce même type de caractérisation moléculaire est effectué pour les transformants obtenus par transformation via *Agrobacterium tumefaciens* selon l'exemple 4b).



**EXEMPLE 5 : Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+).**

5 ***5.a) Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité (SSB/+) hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité par co-transformation du maïs avec les plasmides des exemples 2a , 2b (plasmides restaurateurs) et 3a) (plasmide pDM 302 de sélection).***

10 On utilise préférentiellement une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules.

Production d'embryons immatures :

15 Elle consiste à l'autofécondation d'une plante de la lignée Hill ou au croisement "frère-soeur" (sib) de 2 plantes de la lignée Hill. La fécondation est réalisée à date unique après avoir isolé les organes reproducteurs.

Prélèvement de l'épi :

20 Le prélèvement des épis est réalisé lorsque les embryons immatures ont atteint une taille de 1,5 mm à 2 mm, c'est à dire 10 à 11 jours après la fécondation dans nos conditions de culture (température de 25°C le jour et 18°C la nuit, photopériode 16/8).

Désinfection :

25 Les épis récoltés sont débarrassés de leurs spathes et de leurs soies puis sont désinfectés au Domestos® 20% (v/v) pendant 15 minutes sous agitation. Les épis seront rincés trois fois à l'eau stérile.

Extraction des embryons :

30 La partie supérieure du grain est coupée de façon à découvrir l'albumen, puis une légère pression sur le grain permet de dégager l'albumen. L'embryon immature qui se trouve encore dans le grain (contre le péricarpe) est extrait puis déposé sur le milieu de callogénèse N6P6 en l'orientant côté plat sur la gélose. Trente six

embryons par boîte sont mis en culture pendant 4 jours en chambre de culture à 26 °C et à l'obscurité. Il s'agit de la période d'initiation.

### Transformation génétique :

#### 5 - Préparation des embryons :

Après la période d'initiation, les embryons sont déposés 4 heures avant le tir sur le milieu de choc osmotique N6P6 0.4 M et sont disposés par 36 en un petit carré de 2 cm<sup>2</sup> au centre de la boîte. Les boîtes sont scellées au scello-frais et incubées en chambre de culture (obscurité à 26°C ).

10

Les plasmides portant les gènes à introduire (plasmides décrits dans les exemples 2a, 2b et 3a) sont purifiés sur colonne Qiagen® en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont  
15 projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (1992).

Les boîtes d'embryons ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24h  
après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu  
20 d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé. Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en des composés actifs de certains herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...). De manière préférentielle, le gène de résistance à l'herbicide Basta® sera utilisé.

25

#### - Maturation et régénération des cals de type II :

Lorsqu'on a suffisamment de matériel pour un événement, on le transfère sur le milieu de maturation MM+G2 qui favorise le développement d'embryons somatiques. On étale le cal à la surface du milieu MM+G2. Les boîtes sont mises en chambre de culture à l'obscurité et à 26°C. Après 15 jours (minimum) sur le milieu MM+G2, des  
30 embryons somatiques apparaissent. Ces derniers sont repiqués sur milieu de régénération RM+G2 (20 à 25 par boîte) et cultivé à 28°C et à la lumière (16h/24h). On considère que 4 boîtes en régénération sont suffisantes pour obtenir des régénérants.

Après environ 15 jours sur le milieu RM+G2, les embryons se sont développés en plantules qui sont ensuite repiquées en tubes sur le milieu d'enracinement T1+G2. On considère que 5 plantules par évènement sont nécessaires pour réussir l'acclimatation au phytotron et les envois. Ces plantules sont mises en chambre de culture à la lumière.

On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent de sélection (glufosinate d'ammonium), habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. L'efficacité de transformation est de 10 %.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

#### - Acclimatation :

L'acclimatation des plantules est réalisée quand ces dernières se sont suffisamment développées sur T1+G2 c'est à dire lorsque les racines atteignent le fond du tube et lorsque l'axe collinaire est suffisamment rigide et développé. Les plantules sont acclimatées au phytotron en godets avec du terreau légèrement enrichi. Les godets sont disposés sur tablette située à 1,5 mètres des lampes. Pour maximiser l'obtention de descendance, l'acclimatation de 2 plantules au phytotron est nécessaire. En moyenne, deux semaines sont nécessaires pour le sevrage des plantules.

Les plantes ainsi régénérées et acclimatées sont ensuite cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

Ce mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) par co-transformation d'une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2a, 2b et 3a est le premier mode de réalisation.

Un deuxième mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité (SSB/+) hétérozygote pour le gène restaurateur de la

fertilité consiste à co-transformer une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2a et 3a selon le même protocole que décrit ci-dessus.

Un troisième mode de réalisation consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) consiste à co-transformer une plante de maïs avec les plasmides des exemples 2b et 3a selon le même protocole que décrit ci-dessus.

**5.b) Production d'une lignée de maïs restauratrice de la fertilité (SSB/+) hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité par co-transformation du maïs avec les plasmides des exemples 2c (plasmide pRec 4962 restaurateur) et 3b (plasmide pRec 273 de sélection).**

La production de la lignée de maïs restauratrice de la fertilité selon le présent exemple 5b est réalisée par co-transformation d'une plante de maïs avec les plasmides décrits selon les exemples 2c et 3b avec la technique de cotransformation par *Agrobacterium* connue de l'homme de l'art.

Le gène bar (gène de sélection) est éliminé lors de la co-transformation. 10% des transformants obtenus contiennent les 2 cassettes d'expression contenues dans les plasmides 2c et 3b. Il y aura ségrégation dans la descendance.

Ce mode de réalisation (4<sup>ème</sup> mode) consistant à produire une lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) est le mode préférentiel selon la présente invention.

### **5.c) Caractérisation moléculaire des transformants**

Le transformant SSB-001a- obtenu selon l'exemple 5a) a été caractérisé par la même méthodologie que celle décrite selon l'exemple 4c de la présente invention.

L'analyse moléculaire a été réalisée sur le transformant SSB-001a- résistant à l'herbicide Basta® (n° de plante 12928), sur une plante sœur résistante à l'herbicide Basta® (n° de plante 12929), et sur 2 plantes sensibles à l'herbicide (13008 et 13061). Ces 4 plantes sont issues de l'épi du transformant primaire SSB-001a. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction Eco RV et Hind III. Trois sondes ont été utilisées pour l'analyse : promoteur A9 (pA9), promoteur HMWG (pHMWG) et Bar.

Les résultats des hybridations moléculaires avec la sonde Bar indiquent que les profils moléculaires sont identiques pour les deux plantes résistantes à l'herbicide Basta. Les hybridations avec les sondes pA9 et pHMWG révèlent un grand nombre de bandes, reflétant une intégration en plusieurs copies des plasmides p3222 et p3223. L'hybridation avec la sonde Bar montre un profil simple, une bande majeure est révélée pour les 2 enzymes Eco RV et Hind III. La taille du fragment révélé par la digestion Hind III est de 8 kb. Les bandes d'intensité très faible correspondent aux signaux très intenses révélés précédemment avec les sondes pA9 et pHMWG.

**EXEMPLE 6 : Croisement de la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) avec la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+) : obtention des plantes F1.**

La lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) résistante à l'herbicide Basta® obtenue selon l'exemple 4a est croisée avec la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+), plante résistante à l'herbicide Basta® issue d'un grain déprimé, obtenue selon l'exemple 5 afin d'obtenir les plantes F1. Le même type de croisement peut être réalisé entre la lignée de maïs mâle stérile hétérozygote (AMS/+) obtenue selon l'exemple 4b, et la lignée de maïs restauratrice de la fertilité hétérozygote pour le gène restaurateur de la fertilité (SSB/+), obtenue selon l'exemple 5. La fécondation est réalisée manuellement par une technique connue de l'homme de l'art. La plante mâle stérile est menée à floraison, le pollen de la plante (SSB/+) est déposé sur les soies de la lignée mâle stérile.

A l'issue de ce croisement, des analyses génétiques sont effectuées sur les plantes F1. Les analyses génétiques consistent en un comptage, en rapport à la présence des différents marqueurs, parmi la descendance.

Toutes les fréquences théoriques mentionnées sont vraies si et seulement s'il n'y a pas de liaison entre le transgène AMS et le gène restaurateur de la fertilité.

Bilan génétique de la F1 :

	AMS	+
SSB	SSB/+ ; AMS/+	SSB/+ ; +/+
+	AMS/+ ; +/+	+/+ ; +/+

Bilan phénotypique de la F1 :

Phénotype Grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	50 %	50 %	50 %
Déprimés	50 %	100 %	0 %

5 La F1 est donc composée pour moitié de grains normaux, l'autre moitié étant des grains déprimés (phénotype 'petit grain' causé par les gènes *shrunk2* et *brittle2* en orientation antisens).

Pour chaque F1, nous avons évalué la ségrégation pour la résistance au glufosinate afin de détecter les lots de grains déprimés.

10 Les grains déprimés sont sélectionnés par un tri visuel sur l'épi de maïs. Ces grains sont tous résistants à l'herbicide Basta®.

Les grains déprimés, qui ont le génotype (AMS/+ ; SSB/+) ou (+/+ ; SSB/+), sont sélectionnés, puis semés et mis à germés.

### 15 **EXEMPLE 7 : Autofécondation des plantes F1 pour production de la F2 :**

Les plantes F1 résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains déprimés selon l'exemple 6 sont autofécondées afin d'obtenir les plantes F2.

20 Les plantes F1 issues de grains déprimés étant constituées à la fois de plantes de génotype (SSB/+ ; +/+) et de plantes de génotype (SSB/+ ; AMS/+), deux cas d'autofécondations se présentent alors :

#### **7.a) Autofécondations des plantes de génotype (SSB/+ ; +/+)**

25 Les plantes F1 de génotype (SSB/+ ; +/+) obtenues selon l'exemple 6 sont autofécondées. A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées sur les plantes F2 :

Bilan génétique de la F2 :

	SSB	+
SSB	SSB/SSB ; +/+	SSB/+ ; +/+
+	SSB/+ ; +/+	+/+ ; +/+

5 Bilan phénotypique de la F2 :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	0 %	100 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

10 Cette étape d'autofécondations des plantes de génotype (SSB/+ ; +/+) peut être avantageusement éliminée par une étape de génotypage en effectuant une PCR spécifique du transgène AMS sur les plantes F1 issues de grains déprimés selon l'exemple 6. Les grains déprimés sont mis à germer, les plants de maïs autofécondés, et un tri moléculaire est effectué par PCR. Seules les plantes positives pour la détection du transgène AMS par PCR sont conservées.

15 Les amorces spécifiques du gène d'intérêt AMS (pA9-Barnase-CaMV) permettant son amplification par PCR sont les suivants :

Nom	Commentaires	Séquence
A9A (Pro A9)	Direct	TAGACATTGTAGGTTGGTTTTG (SEQ ID n°9)
Barn 1 (barnase)	Direct	GCACAGGTTATCAACACGTTTGAC (SEQ ID n°10)
Barn 4 (barnase)	Direct	ATCCGGCCATTTCTGAAGAGAA (SEQ ID n°11)
A9B (Pro A9)	Reverse	TCTAGTTACTTCATAAGTTTTG (SEQ ID n°12)
Barn 6 (barnase)	Reverse	TTGCGGGTTTGTGTTTCCATATTG (SEQ ID n°13)
CaMVol1 (3'CaMV)	Reverse	ATTGATAAGGGGTTATTAGGGG (SEQ ID n°14)

La taille du fragment amplifié à l'aide des couples d'amorces A9A / A9B, Barn1 / Barn 6 ou Barn4 / CaMVol1 est 799 pb, 880 pb ou 979 pb, respectivement.

#### 5 7.b) Autofécondations des plantes de génotype (AMS/+ ; SSB/+)

Les plantes F1 de génotype (AMS/+ ; SSB/+) obtenues selon l'exemple 6 sont autofécondées afin d'obtenir la descendance F2. A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées sur la descendance F2 :

Bilan génétique de la F2 :

	AMS ; +	+ ; SSB	AMS ; SSB	+ ; +
AMS ; +	AMS/AMS ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/+ ; +/+
+ ; SSB	AMS/+ ; SSB/+	SSB/SSB ; +/+	AMS/+ ; SSB/SSB	SSB/+ ; +/+
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/+ ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/+ ; SSB/+
+ ; +	AMS/+ ; +/+	SSB/+ ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	+/+ ; +/+

Bilan phénotypique de la F2 :



Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	75 %	25 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

L'analyse génétique de la descendance F2 sur les grains normaux (25 %) pour l'expression du gène barnase avec la résistance à l'herbicide Basta®, permet de déterminer les plantes hybrides F1 qui présentaient le génotype (SSB/+ ; AMS/+). Au niveau des plantes F2 issues des grains déprimés, 1/6 ont le génotype (AMS/AMS ; SSB/+). sur les plantes F2 qui ont des grains normaux, 1/4 ont le génotype (AMS/AMS ; +/-).

### 7.c) Résultats

14 épis F2 ont été produits. Pour chacun de ces épis, un tri par rapport au phénotype du grain (déprimé ou pas) à été effectué. 14 lots de graines transgéniques (de A à N) ont donc été analysés. Ces 14 lots de graines (lot A à lot N) ont été divisés en deux en fonction de leur phénotype normal ou déprimé. Le code utilisé pour les 28 ensembles de graines ainsi préparés est par exemple pour le lot A : A 01 = grains normaux, A02 = grains « déprimés ».

### **EXEMPLE 8 : Semis des grains déprimés de la descendance F2 et génotypage des plantes (AMS/AMS ; SSB/+) :**

Un semis dirigé des grains F2 obtenus ci-dessus, en fonction du phénotype, déprimé ou normal du grain, puis la détection par génotypage des plantes (AMS/AMS ; SSB/+) ont été effectués.

### 8.a) Semis de la descendance F2

Un semis dirigé des 14 familles a été effectué et au stade 3-4 feuilles un test Basta en spray 0,5% a été réalisé. Les résultats de ce test sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Code	Phénotype grains	Nbre de grains semés	Nbre de levées		Nbre de résistantes		Nbre de sensibles	
			/ grains semés	%	/ grains semés	%	/ grains semés	%
A 01	normaux	30	30	100	27	90	3	10
A 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
B 01	normaux	30	28	93,3	0	0	24	85,7
B 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
C 01	normaux	30	30	100	19	63,3	11	36,7
C 02	déprimés	60	59	98,3	56	94,9	3	5,1
D 01	normaux	30	30	100	20	66,7	10	33,3
D 02	déprimés	60	60	100	57	95	3	5
E 01	normaux	30	30	100	19	63,3	11	36,7
E 02	déprimés	50	48	96	48	100	0	0
F 01	normaux	30	30	100	2	6,7	28	93,3
F 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
G 01	normaux	30	29	96,7	21	72,4	8	27,6
G 02	déprimés	60	59	98,3	59	100	0	0
H 01	normaux	15	15	100	7	46,7	8	53,3
H 02	déprimés	30	29	96,7	29	100	0	0
I 01	normaux	30	30	100	0	0	24	80
I 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
J 01	normaux	30	30	100	0	0	27	90
J 02	déprimés	60	59	98,3	55	93,2	4	6,8
K 01	normaux	30	30	100	21	70	9	30
K 02	déprimés	60	60	100	58	96,7	5	8,3
L 01	normaux	30	30	100	0	0	29	96,7
L 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
M 01	normaux	30	30	100	22	73,3	7	23,3
M 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0
N 01	normaux	30	28	93,3	20	71,4	7	25
N 02	déprimés	60	60	100	60	100	0	0

Les résultats du test ont permis d'éliminer les familles B, F, I, J, et L qui résultaient de l'autofécondation de plantes F1 avec le génotype (SSB/+ ; +/+).

Les familles A, C, D, E, G, H, K, M, et N ont été conservées. Ces épis résultaient de l'autofécondation de plantes F1 avec le génotype (SSB/+ ; AMS/ +). Les bilans génétique et phénotypique de l'autofécondation de ces plantes ont été détaillés dans l'exemple 7b. Dans ces familles sélectionnées, toutes les plantes  
5 résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains normaux (lots finissant par 01) et jusqu'à 40 plantes résistantes à l'herbicide Basta® issues de grains déprimés ont été gardées pour culture.

**8.b) Identification par génotypage et Southern Blot des plantes de génotype  
10 (AMS/AMS;SSB/+) :**

Une analyse moléculaire est effectuée pour identifier les plantes homozygotes pour le transgène issu de STB-27b (AMS/AMS) et hétérozygotes pour le transgène issu de SSB001a- (SSB/+).

15 L'ADN génomique de la descendance a été extrait à partir de 50 mg de feuilles suivant le protocole et utilisation du kit d'extraction Qiagen Dneasy 96 plant kit (Qiagen SA, 91974 Courtaboeuf cedex, France). La méthodologie Southern est utilisée pour identifier les profils moléculaires.

Pour chaque individu, on visualise la présence des deux gènes Bar : celui  
20 venant de STB27b et celui venant de SSB001a. Pour cela, les ADN ont été digérés avec l'enzyme Hind III puis hybridés avec la sonde Bar. D'après les analyses moléculaires réalisées sur les transformants parents, nous savons qu'un fragment d'une taille de 8 kb correspond à la copie du gène Bar issu du transformant SSB001a et un fragment d'une taille de 1.7 Kb correspond à la copie du gène Bar issu du  
25 transformant STB27b. Pour une plante donnée, l'intensité des signaux d'hybridation est également évaluée, ceci afin d'identifier la zygotie (hétérozygotie ou homozygotie) des plantes pour le gène Bar considéré (SSB001a ou STB27b).

Cette analyse nous permet donc d'identifier le génotype des plantes issues du croisement SSB x STB. D'après la sélection préalable des graines dont sont issues  
30 ces plantes, 6 génotypes sont attendus et présentés dans le tableau 1.

Tableau 1:

Génotype			% théorique
Nb copies Bar de SSB-001a	Nb copies Bar de STB-27b		
2	0	A	8,3
2	1	B	16,7
2	2	C	8,3
1	0	D	16,7
1	1	E	33,3
1	2	F	16,7
Total			100

Le génotype recherché dans cette étude est l'homozygotie pour le T-DNA de STB-27b (« 2 copies » du gène Bar) et l'hétérozygotie pour le gène Bar SSB-001a (« 1 copie » du gène Bar).

Des Southern blots ont été réalisés avec l'ADN de 8 plantes filles provenant d'un épi et ce, sur les 9 épis sélectionnés. 58 plantes ont été génotypées suivant le protocole décrit précédemment. Tous les génotypes attendus sont représentés parmi les 9 plantes analysées (2 épis différents).

Au total, 10 plantes présentent le génotype d'intérêt à savoir : homozygotie pour le T-DNA de STB-27b (« 2 copies » du gène Bar) et hétérozygotie pour le gène Bar SSB-001a (« 1 copie » du gène Bar). Les fréquences observées sont très proches des fréquences théoriques attendues quel que soit le génotype considéré (Tableau 2).

Tableau 2 :

Génotype		Total	% observé	% théorique
Nb copies Bar de SSB-001a	Nb copies Bar de STB-27b			
2	0	3	5,2	8,3
2	1	9	15,5	16,7
2	2	3	5,2	8,3
1	0	11	19	16,7
1	1	22	37,9	33,3
1	2	10	17,2	16,7
Total		58	100	100

**EXEMPLE 9 : Obtention de semences de pré-base (AMS/AMS ; +/+), de semences de base (AMS/+ ; +/+), et de semences hybrides**

Selon le type de semence obtenu à l'exemple précédent, deux types de croisement peuvent être effectués :

**9.a) Autofécondation des plants (AMS/AMS ; SSB/+) afin d'obtenir des semences de pré-base :**

L'intérêt de ce croisement est de multiplier la lignée avec le génotype (AMS/AMS ; SSB/+) ainsi que de produire des semences avec le génotype (AMS/AMS ; +/+) ou semences de pré-base.

En effet, les autofécondations produisent de la semence homozygote pour le transgène conférant la stérilité mâle (au niveau de la F3, tous les grains normaux seront de génotype (AMS/AMS ; +/+)). A l'issue de cette autofécondation, les analyses génétiques sont effectuées :

Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+
AMS ; +	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+
AMS ; SSB	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; SSB/SSB	AMS/AMS ; SSB/+
AMS ; +	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+	AMS/AMS ; SSB/+	AMS/AMS ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	25 %	100 %	0 %
Déprimés	75 %	100 %	0 %

La totalité des grains normaux ont le génotype (AMS/AMS ; +/+). Il s'agit des  
5 semences de pré-base. 75 % des grains déprimés ont le génotype (AMS/AMS ;  
SSB/+).

**9.b) Croisement des plants de génotype (AMS/AMS ; SSB/+) avec la lignée  
élite de génotype sauvage (WT) afin d'obtenir des semences de génotype  
10 (AMS/+ ; +/+):**

Les plantes issues de grains déprimés sont croisées avec une lignée élite WT.  
A l'issue de ce croisement, les analyses génétiques sont effectuées :

15 Bilan génétique :

	AMS ; SSB	AMS ; +	AMS ; SSB	AMS ; +
+ ; +	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+	AMS/+ ; SSB/+	AMS/+ ; +/+

Bilan phénotypique :

Phénotype grains	Ségrégation grains	Ségrégation Basta	
		Résistantes	Sensibles
Normaux	50 %	100 %	0 %
Déprimés	50 %	100 %	0 %

20 Deux cas de figures se présentent :

- dans 2/3 des cas les plantes F2 avaient le génotype (AMS/+ ; +/+). Sur ces épis F3  
seuls sont obtenus des grains normaux avec une ségrégation à l'herbicide Basta® de  
50/50. Ces épis ne nous intéressent pas.

- dans 1/3 des cas les plantes F2, avaient le génotype (AMS/AMS ; +/-). Sur ces épis F3 seuls sont obtenus des grains normaux avec un génotype (AMS/+ ; +/-) 100% résistants à l'herbicide Basta®. Ce sont ces épis qui nous intéressent. Les grains normaux de génotype (AMS/+ ; +/-) constituent les semences de base.

- 5 20 graines de chaque épi F3 sont semées et les épis d'intérêt sont identifiés en fonction de la résistance à l'herbicide Basta®.

### **EXEMPLE 10 : Tri par table densimétrique des grains déprimés :**

- 10 La table densimétrique utilisée permet de diviser en six fractions, des grains de taille et de qualité superficielle équivalentes, mais qui diffèrent entre eux par leur poids spécifique.

Un tri densimétrique est effectué sur un lot de graines d'épis F3, issues de l'autofécondation de plantes de génotype [+/- ; SSB/+]. Théoriquement, ces épis ont  
15 une proportion de 75% de grains déprimés et 25% de grains normaux. 33 épis ont été égrainés de manière à obtenir environ 500 grammes de semences. 6 fractions de grains ont été constituées par tri densimétrique.

- Le tableau ci-dessous est une synthèse des résultats obtenus (triage par rapport au phénotype du grain et analyses génétiques sur l'expression du gène bar  
20 conférant la résistance au glufosinate).

	nbre total de grains	Triage phénotype grain		Résultats analyses génétiques						
		nbre de grains normaux	nbre de grains déprimés	nbre grains semés	nbre levées		nbre résistantes		nbre sensibles	
					/ grains semés	%	/ levées	%	/ levées	%
Fraction 1	50	0	50	40	36	90	36	100	0	0
Fraction 2	69	0	69	60	49	81,7	49	100	0	0
Fraction 3	445	27	418	160	156	97,5	149	96	7	4
Fraction 4	97	8	89	80	80	100	72	90	8	10
Fraction 5	540	103	437	160	154	96,3	120	78	34	22
Fraction 6	779	756	23	160	155	96,9	6	4	149	96

- 25 Triage par rapport au phénotype du grain (normal ou déprimé) :

Les fractions 1 et 2 ne comportent que des grains déprimés.

Dans les fractions 3, 4 et 5 nous avons essentiellement des grains déprimés mais nous trouvons également quelques grains normaux (soit 6.1, 8.2 et 19.1% respectivement pour les fractions 3, 4 et 5).

Quant à la fraction 6 nous avons quasiment que des grains normaux (97%).

5 Les fractions 1 à 5 correspondent donc aux grains déprimés et la fraction 6 aux grains normaux.

On retrouve également une petite quantité de grains non triés. Cette petite quantité correspond à la fois à des grains normaux et à des grains déprimés.  
10 Cependant, visuellement, les grains déprimés sont plus importants en nombre par rapport aux grains normaux.

Résultats d'analyses génétiques (sur l'expression du gène bar conférant la résistance à l'herbicide Basta®) :

15 Les résultats d'analyses génétiques confortent ceux du triage fait sur le phénotype du grain pour chacune des fractions.

20 Nous avons donc dans la fraction 6 une petite partie de grains déprimés (environ 3 à 4%). Cette dernière est complètement éliminée par un deuxième passage sur la table densimétrique.

Les fractions de 1 à 5 correspondent aux grains déprimés et la fraction 1 aux grains normaux. Les grains déprimés représentent 61,7% de la masse de grains totale, une proportion légèrement inférieure au 75% théoriques qui peut notamment  
25 s'expliquer par le fait que les grains déprimés ont une masse légèrement inférieure à celle des grains normaux.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- An et al. (1986) *Plant Physiol.* 81, 86-91.
- Anderson, O.D., Green, F.C., Yip, R.E., Halford, N.G., Shewry, P.R. and  
5 Malpica-Romero, J.-M. (1989) *Nucl. Acid. Res.* 17, 461.
- Bevan et al. (1984) *Nucleic Acid Research*, 11, 369-385.
- Cao J., Duan, X., McElroy, D. and Wu, R. (1992) *Plant. Cell. Rep.* 11, 586-  
591.
- Depicker et al., (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 561-573.
- 10 - Di Fonzo N, et al. (1988) *Mol Gen Genet* 212(3), 481-7.
- Finer J. (1992) *Plant Cell Report* 11 : 323-328.
- Franck et al. (1980) *Cell*, 21, 285-294.
- Fromm et al. (1986) *Nature*, 319, 791-793.
- Hartley, R.W (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 913-915.
- 15 - Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) *Nat. Biotechnol.* 14(6):745-50.
- Jouanin et al. (1987) *Plant Sci.*, 53, 53-63.
- Klein (1987) *Nature* 327 :70-73.
- Krens et al. (1982) *Nature*, 296, 72-74.
- 20 - McElroy D., Blowers, A.D., Jeness, B. and Wu, R. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 231, 150-160.
- Messing J. et al. (1983) *Methods in Enzymology*, 101, 20-78.
- Paul, W., et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 19 : 611-622.
- Robert et al. (1989) *Plant Cell*, 1 : 569-578.
- 25 - Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Southern E.M. (1975) *J. Mol Biol.* 98 : 503-517.
- Watson et al. (1994) Ed. De Boeck Université, pp 273-292.
- 30 - White, J., Chang S-YP., Bibb, MJ. and Bibb, MJ. (1990) *Nucl. Acid. Res.* 18, 1062.
- Yoder et al. (1993) *Bio/Technology*, 12, 263-292.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",  
comprenant les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

2. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",  
comprenant les étapes consistant à :

- a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",
- b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a)
- c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b),
- d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

3. Semence de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou 2.

5

4. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS"), comprenant les étapes consistant à :

10

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

15

b) sélectionner par le phénotype "petit grain" les semences de maïs comprenant dans leur génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences sélectionnées selon l'étape b),

20

d) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),

f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

25

5. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle ("AMS") comprenant les étapes consistant à :

30

a) croiser un plant de maïs mâle stérile hétérozygote pour le transgène AMS avec un plant de maïs restaurateur de la fertilité comprenant dans son génome un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

b) réaliser un génotypage des semences obtenues par le croisement selon l'étape a),

c) autoféconder les plants de maïs issus des semences génotypées selon l'étape b)

d) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour le gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain",

e) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon l'étape d),

f) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS.

6. Procédé de production de semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS, comprenant les étapes consistant à :

a) autoféconder des plants de maïs issus de semences selon la revendication 3,

b) sélectionner des semences homozygotes pour un transgène AMS.

7. Procédé selon l'une des revendications 1, 2 et 4 à 6, caractérisé en ce qu'au moins une étape de sélection comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison.

8. Procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS comprenant le croisement d'un plant de maïs issu d'une semence homozygote pour un transgène AMS, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 4 à 7, avec un plant de maïs de génotype sauvage.

9. Procédé de production d'une semence hétérozygote pour un transgène AMS, caractérisé en ce que le procédé selon l'une des revendications 4 à 7 comprend en outre le croisement d'un plant de maïs issu de ladite semence homozygote pour un transgène AMS avec un plant de maïs de génotype sauvage.

10. Procédé selon l'une des revendications 1, 2 et 4 à 9, dans lequel le plant de maïs comprenant un transgène AMS conférant la stérilité mâle nucléaire artificielle est caractérisé en ce que le transgène codant la barnase est compris dans une cassette d'expression, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit promoteur est le promoteur spécifique de la pollénogenèse pA9.
12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que ledit  
5 gène codant un agent de sélection est choisi parmi le gène bar qui confère la résistance à l'herbicide Basta® et le gène NptII qui confère la résistance à la kanamycine, ledit gène étant compris à l'intérieur de l'élément transposable Ds.
13. Cassette d'expression comprenant un gène restaurateur de la fertilité lié  
10 génétiquement à au moins un gène codant un phénotype 'petit grain', associés à des éléments permettant leur expression dans les cellules végétales, notamment un promoteur et un terminateur de transcription.
14. Cassette d'expression selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit  
15 gène restaurateur de la fertilité est le gène barstar placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la pollénogenèse, notamment un promoteur spécifique de l'anthere tel que pA3, pA6, pA9, pTA29, ou du promoteur Mac2, et du terminateur 3'CaMV ou 3'Nos, lié génétiquement à un gène codant un agent de sélection sous le contrôle du promoteur Actine-intron actine et du terminateur 3'CamV ou 3'Nos.  
20
15. Cassette d'expression selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce que ledit gène codant un phénotype 'petit grain' est choisi parmi les gènes shrunken 2 et brittle 2 en orientation antisens.
- 25 16. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisée en ce que le promoteur associé au gène codant un phénotype 'petit grain' est choisi parmi les promoteurs HMWG et B32.
17. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 13 à 16,  
30 caractérisée en ce que ledit terminateur est choisi parmi le terminateur 3'Nos et le terminateur 3'CaMV.
18. Vecteur, notamment plasmide, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cassette d'expression telle que décrite dans l'une des revendications 10 à 17.

19. Hôte cellulaire, notamment bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 18.

5 20. Cellule de maïs transformée par un au moins un vecteur selon la revendication 19.

10 21. Plant de maïs restaurateur de la fertilité caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un gène restaurateur de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

22. Plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", obtenu à partir d'une semence selon la revendication 3.

15

23. Procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

20 a) autoféconder des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 ou 2,

b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et de phénotype "petit grain",

25 c) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" obtenues par autofécondation des plants de maïs obtenus à partir des semences obtenues selon l'étape b).

30 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'étape b) comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison.

19. Hôte cellulaire, notamment bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 18.

5 20. Cellule de maïs transformée par un au moins un vecteur selon la revendication 18.

10 21. Plant de maïs restaurateur de la fertilité caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un gène restaurateur de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".

22. Plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", obtenu à partir d'une semence selon la revendication 3.

15

23. Procédé de multiplication d'un plant de maïs homozygote pour un transgène AMS et hétérozygote pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", comprenant les étapes consistant à :

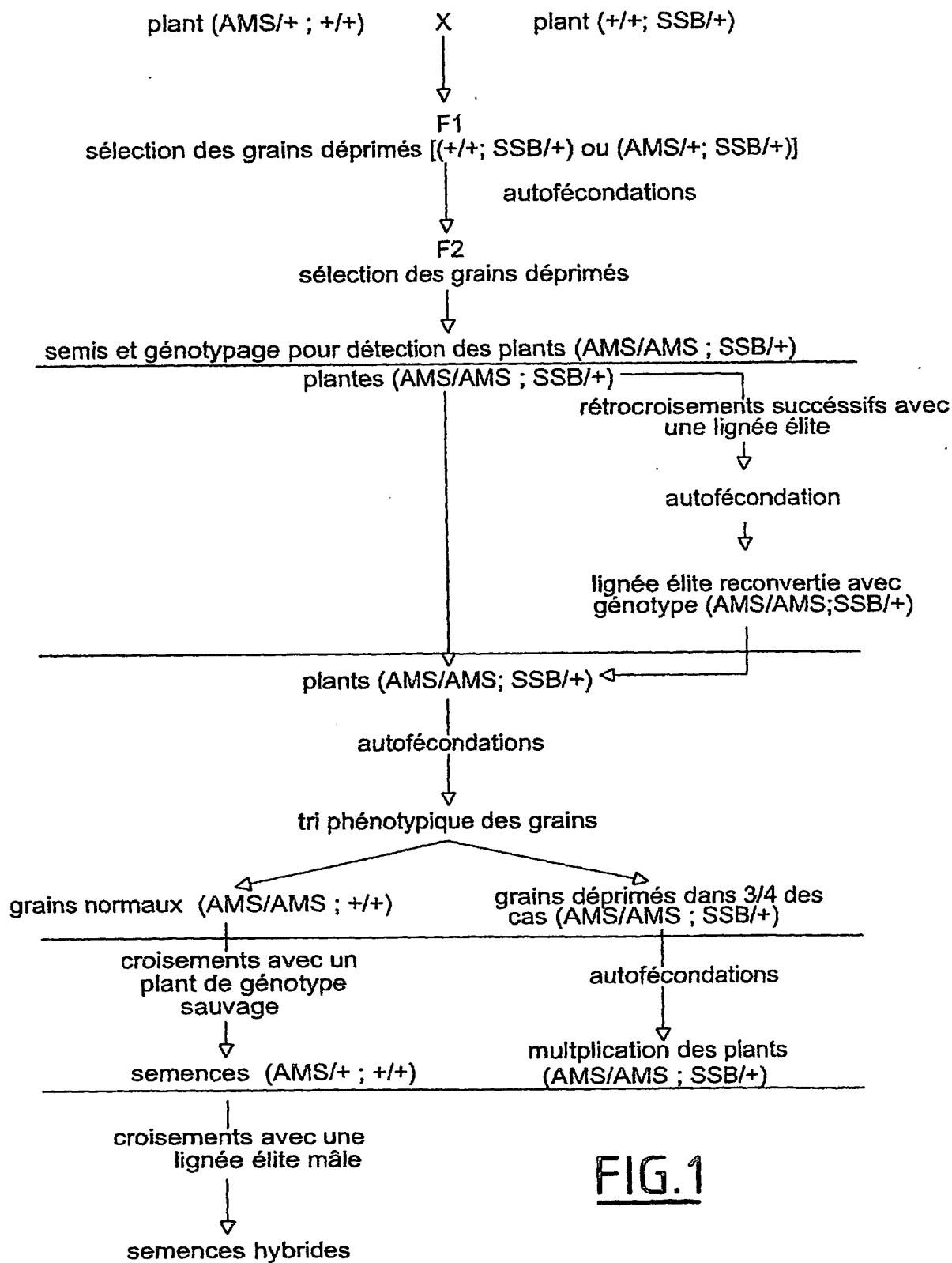
- 20 a) autoféconder des plants de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 ou 2,
- b) sélectionner des semences homozygotes pour le transgène AMS et de phénotype "petit grain",
- 25 c) sélectionner les semences homozygotes pour le transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain" obtenues par autofécondation des plants de maïs obtenus à partir des semences obtenues selon l'étape b).

30 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'étape b) comprend l'utilisation d'une table densimétrique ou d'un système de flottaison.

25. Kit pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il comprend des semences de maïs homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain", et des oligonucléotides spécifiques du transgène l'AMS utiles en tant qu'amorces pour la détection par PCR des semences homozygotes pour un transgène AMS et hétérozygotes pour un gène de restauration de la fertilité lié à un marqueur de phénotype "petit grain".



1/9



**FIG.1**

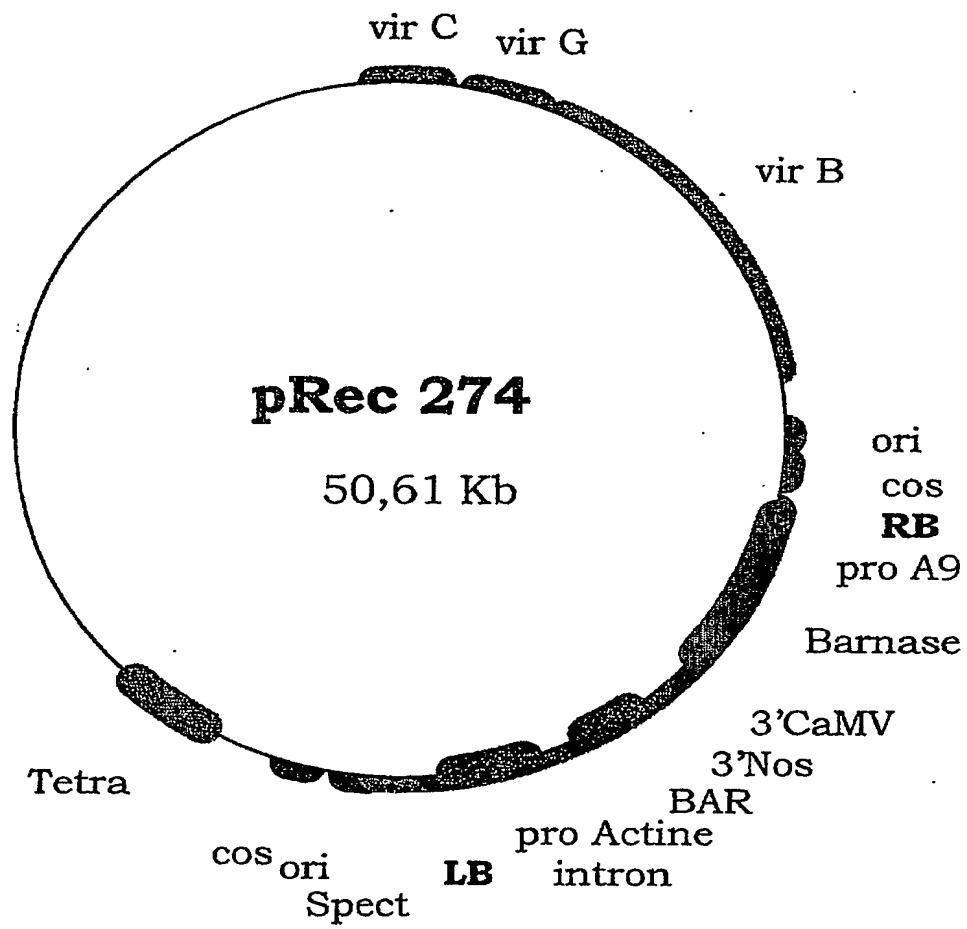
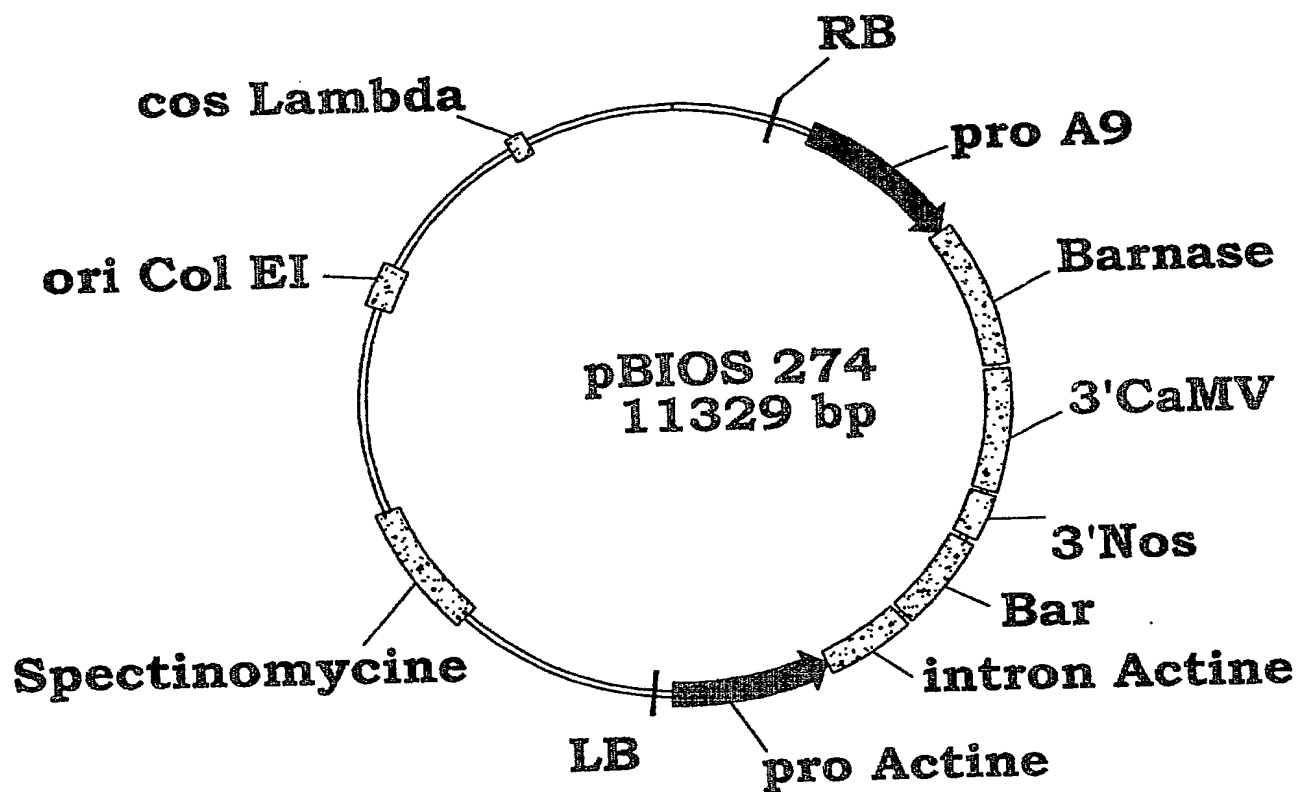
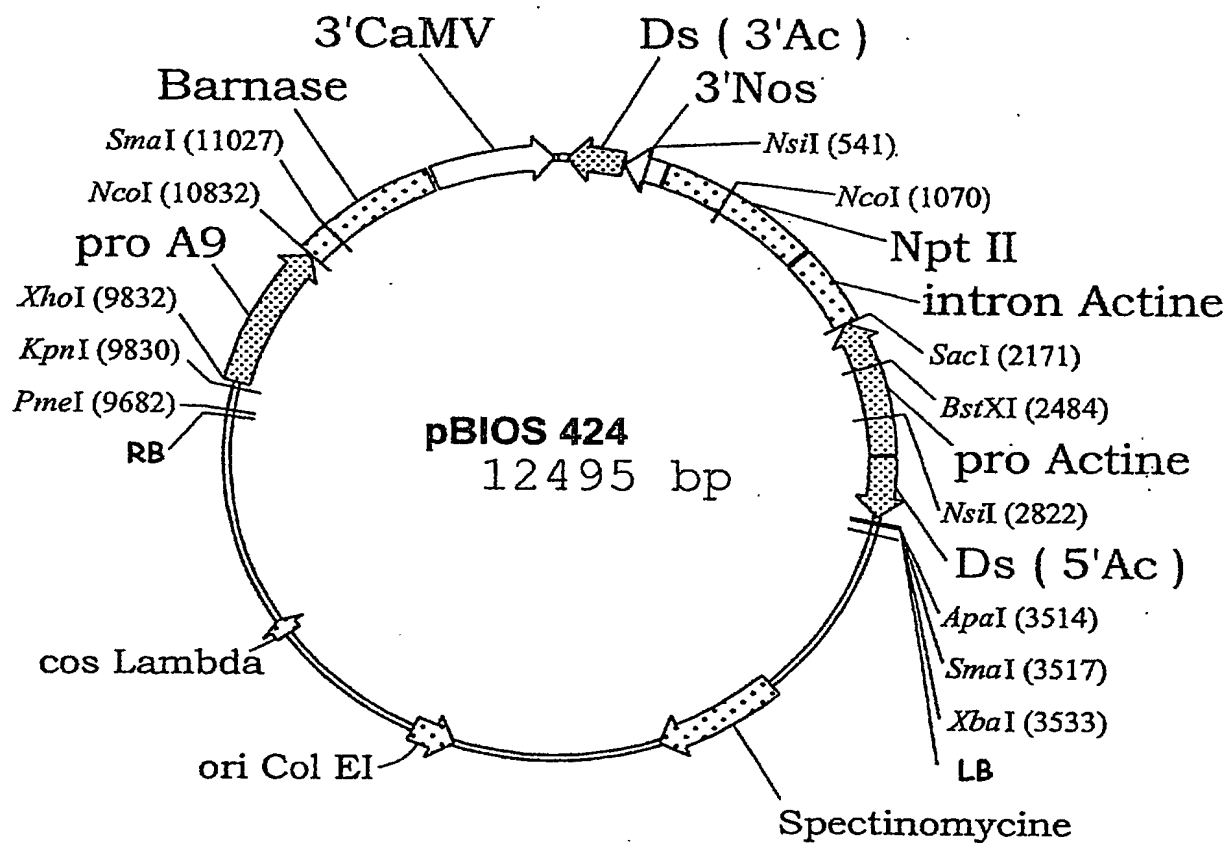


FIG.2

FIG.3

**FIG.4**

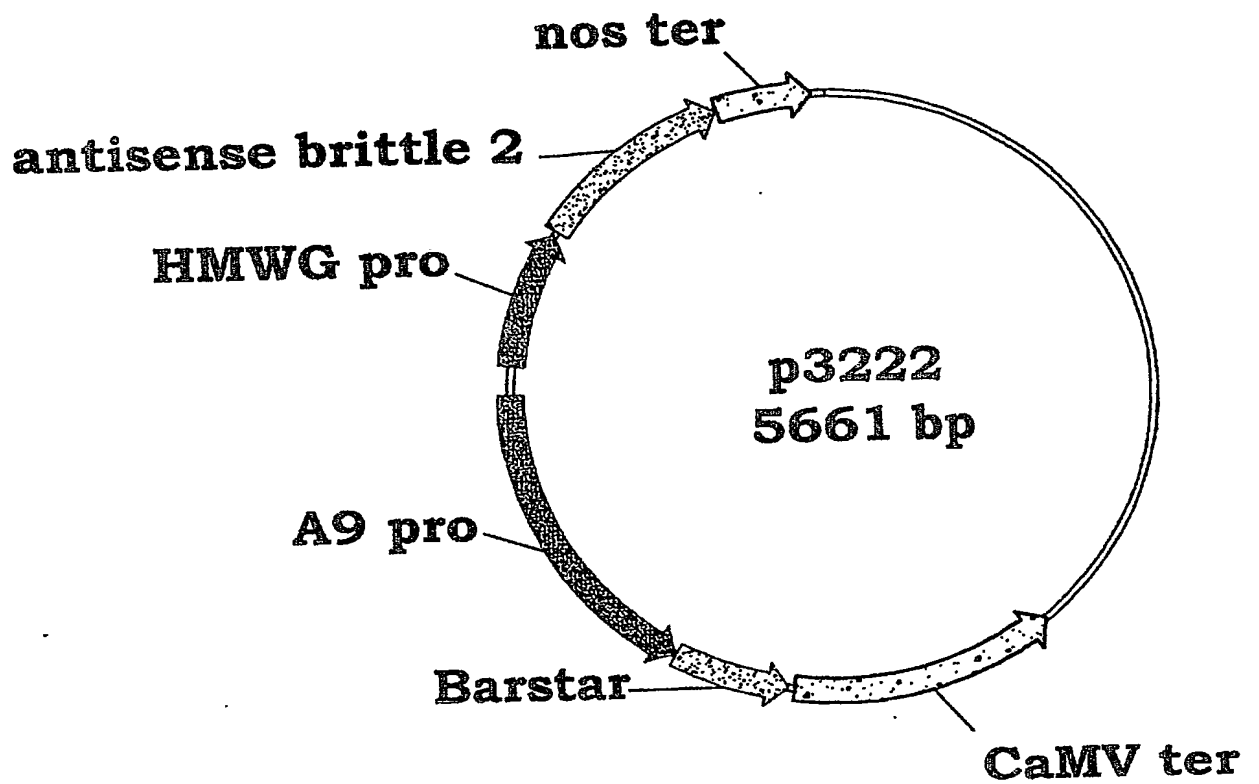


FIG.5

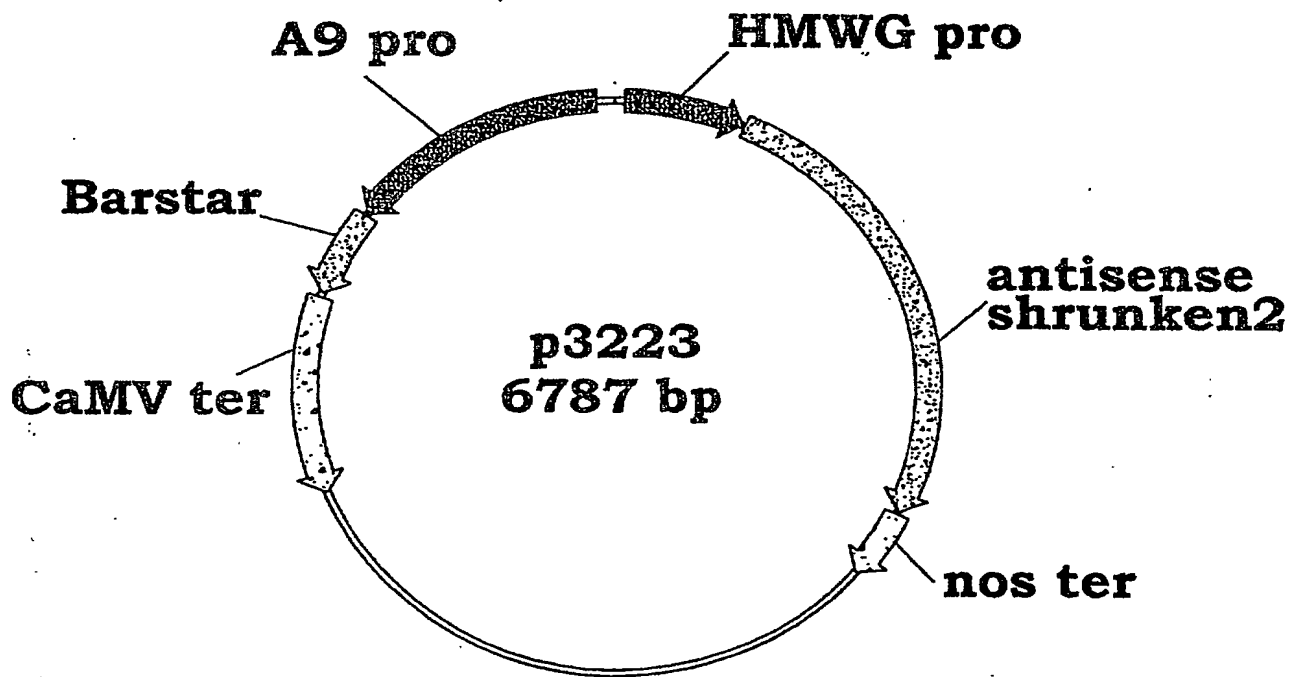
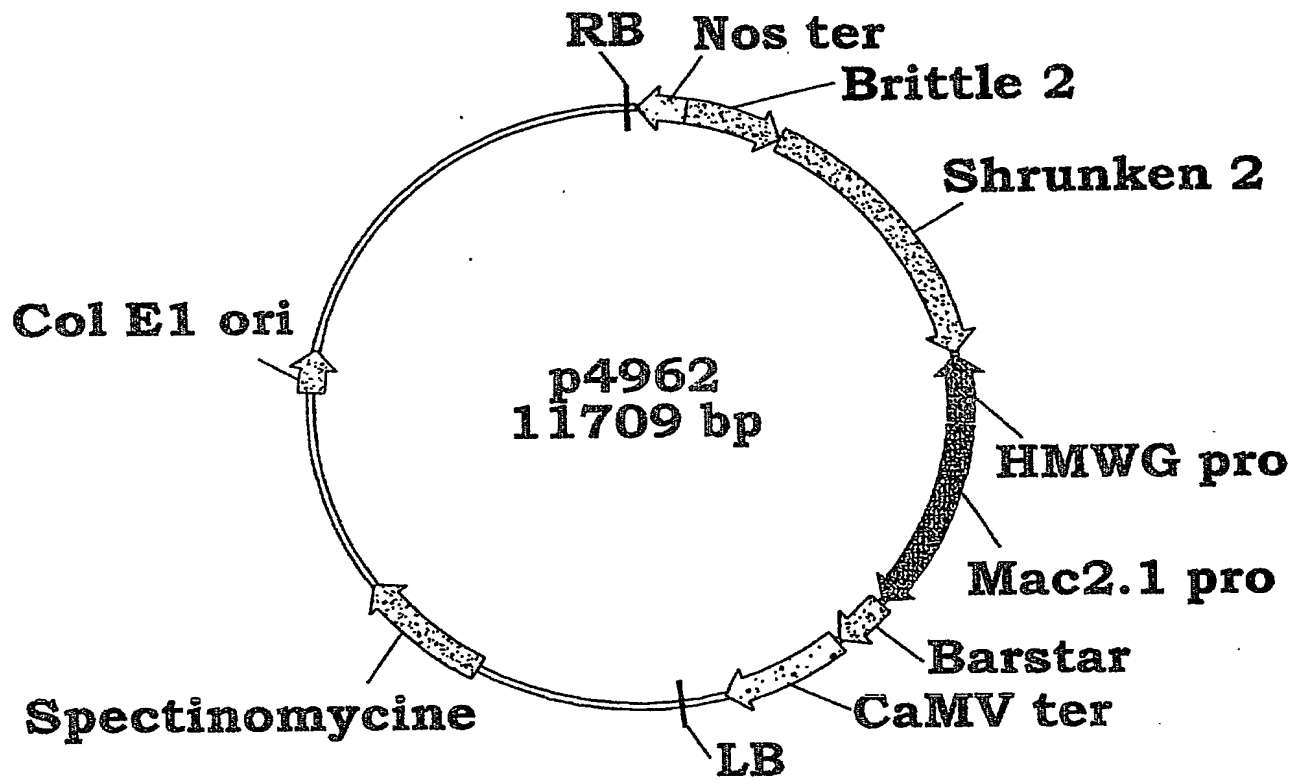
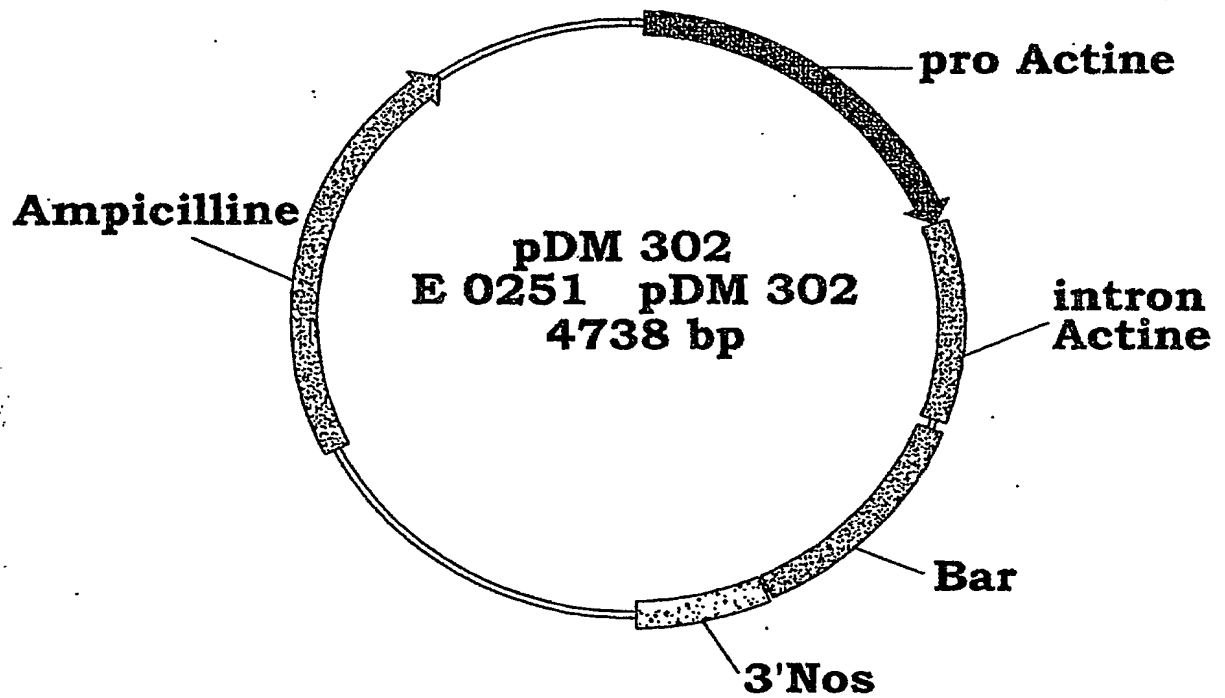
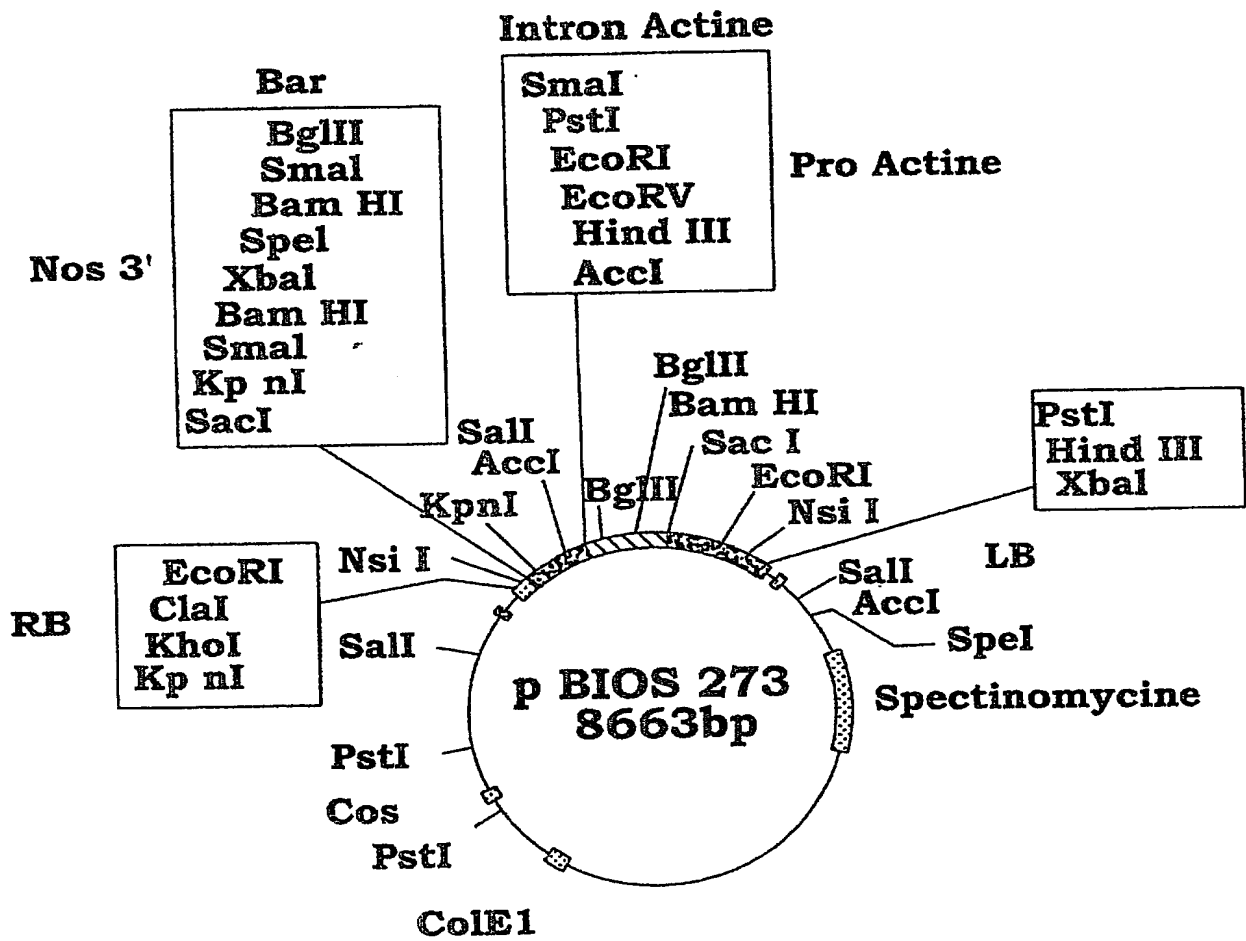


FIG.6

FIG.7

FIG.8



FIG.9

procédé de production  
s hybrides de maïs.  
BFF 01/0576  
ABINET LAVOIX  
Pl. d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09

# LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOGEMMA

<120> Nouveau procédé de production de semences hybrides de maïs

<130> BFF 01/0576

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 1

ccggatccat gtgacagaca gtgtta

26

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 2

aagcccggga cttgtactaa ctgtttc

27

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 3

tatcggatcc aaatcataag aaaggag

27

<210> 4

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 4

gaagatctat attgttcatc ccattg

26

<210> 5

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 5

gcacccggga ggagatatgc agtttg

26

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 6

gactgcagca caaatggtca ag

22

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 7

tatcgatcc aaatcataag aaaggag

27

<210> 8

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 8

gaagatctat attgttcatc ccattg

26

<210> 9

<211> 22

<212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 PCR

<400> 9  
 tagacattgt aggttggttt tg 22

<210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 PCR

<400> 10  
 gcacagggtta tcaacacggtt tgac 24

<210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 PCR

<400> 11  
 atccggccat ttctgaagag aa 22

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 PCR

<400> 12  
 tctagttact tcataagttt tg 22

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce  
 PCR

<400> 13  
 ttgcgggttt gtgtttccat attg 24

<210> 14

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce  
PCR

<400> 14

attgataagg gggtattagg gg

22





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**